

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный университет имени А.Н.Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)»

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

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Научный руководитель:  
Доктор химических наук, профессор  
Кильдеева Н.Р.

Москва – 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ:

	Стр.
Введение	4
1 Литературный обзор	9
1.1 Гидрогели на основе биополимеров	9
1.2 Получение гидрогелей с использованием ионных сшивающих реагентов	11
1.2.1 Изучение условия получения материалов на основе ионных гелей хитозана	18
1.2.2 Материалы медицинского назначения на основе хитозана, сшитого ионными сшивающими реагентами. Системы с контролируемым выделением лекарственных веществ.	24
1.3 Получение гидрогелей хитозана с использованием сшивающих реагентов ковалентного типа	32
1.3.1 Основные аспекты ковалентной сшивки	32
1.3.2 Использование глутарового альдегида в качестве ковалентного сшивающего реагента	37
1.3.3 Модифицирование хитозана сшивающим реагентом природного происхождения дженипином	42
1.3.4 Применение сшивающих реагентов ковалентного типа для создания материалов медицинского назначения	48
2 Методическая часть	53
2.1 Характеристика сырья и реактивов	53
2.2 Методы исследования	54
3 Результаты и их обсуждение	64
3.1 Получение материалов на основе хитозана с использованием сшивающих реагентов ионного типа	64
3.1.1 Изучение взаимодействие между полифосфатами и хитозаном	65
3.1.1.1 Кондуктометрические и нефелометрические исследования взаимодействия хитозана с полифосфатами	67
3.1.1.2 Изучение процесса формирования наночастиц в растворе хитозана	71
3.1.1.3 ИК-спектроскопия хитозана, модифицированного полифосфатами	72
3.1.2 Получение хитозановых пленок, поверхностно-модифицированных полифосфатами	75
3.1.2.1 Исследование влагопоглощающих свойств пленок	75
3.1.3 Получение биологически-активных хитозановых пленок, по-	77

	верхностно-модифицированных полифосфатами, и регулирование их влагопоглощения и фармакокинетических свойств	
3.1.4	Получение хитозановых пленок из формовочных композиций, содержащих полифосфаты	83
3.1.4.1	Исследование морфологии поверхности пленок	84
3.1.4.2	Изучение набухания и растворимость пленок, полученных из растворов хитозана, содержащих полифосфаты	86
3.1.5	Получение и свойства лекарственно-наполненных хитозановых пленок, модифицированных полифосфатами путем введения в формовочный раствор	88
3.2	Модификация хитозана с помощью ковалентных сшивающих реагентов	91
3.2.1	Исследование процесса гелеобразования в растворах хитозана в присутствии природного сшивающего реагента дженипина	92
3.2.1.1	Влияние состава композиций и условий реакции на продолжительность гелеобразования в растворах хитозана	92
3.2.1.2	Исследование кинетики изменения вязкости в процессе сшивки хитозана Gr или GA	98
3.2.1.3	Изучение упругих свойств гидрогелей хитозана, сшитого дженипином	100
3.2.1.4	Изучение кинетики и механизма взаимодействия хитозана с Gr с использованием электронных спектров поглощения	101
3.2.2	Определение степени сшивки хитозана при получении гидрогелей из растворов, содержащих сшивающие реагенты	109
3.2.3	Получение пленок на основе хитозана, сшитого дженипином, и исследование их свойств	115
3.2.4	Получение биополимерных матриц на основе хитозана, сшитого Gr или GA и исследование их свойств	121
	Выводы	130
	Список литературы	132
	Приложение	149

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Гидрогели на основе аминополисахарида хитозана широко применяются в различных областях: медицине, фармацевтике, тканевой инженерии, защите окружающей среды, хроматографии. 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 гранул, шариков, капсул, покрытий, мембран, губок и волокон. 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 аминокислотосодержащих 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 матриц 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<sup>0</sup>С и установлено, что мольное соотношение сшивающий реагент - аминогруппа хитозана определяет раствори-

мость, фармакокинетические и осмотические свойства пленок, при увеличении соотношения ПФ/ $\text{NH}_2$  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 матриц. Показано, что при увеличении pH от 3,8 до 6,4 скорость гелеобразования увеличивается в 7 раз, снижается степень набухания пленок и матриц и возрастает интенсивность синей окраски.

5. Выявленные особенности механизма и кинетики взаимодействия хитозана с Gr 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 матриц с низким содержанием глутарового альдегида по отношению к клеткам фибробластов не превышает цитотоксичность хитозановых матриц, полученных с использованием эквимольного количества природного сшивающего реагента.

**Практическая значимость работы.** Разработан способ получения пленочных материалов на основе хитозана, сшитого ионными сшивающими реагентами путем введения их на стадии получения формовочного раствора;

разработанные пленки пригодны для использования в качестве систем с контролируемым выделением лекарственных веществ. Показана эффективность использования дженипина при получении биополимерных матриц для выращивания клеток.

Получен патент РФ на способ получения пленок из хитозана с использованием полифосфатов 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.

**Достоверность результатов проведенных 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 положительными 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 и издан один патент.

**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.

# 1 Литературный обзор

## 1.1 Гидрогели на основе биополимеров

Гидрогели на основе природных и синтетических полимеров в виде материалов разной физической формы с каждым годом привлекают все большее внимание исследователей. Гидрогели, представляют собой трехмерные полимерные сетки, которые поглощают и удерживают от десятков до десятков тысяч % воды или биологических жидкостей по отношению к их сухому весу. Гидрогели могут быть стабильными или со временем разрушаться вплоть до полного растворения полимера. На их основе разрабатываются новые изделия для медицины, биотехнологии и тканевой инженерии [1]. Гидрогели определяют как трехмерные полимерные сетки, которые набухают в воде и водных растворах [2]. Подавляющее большинство работ в этой области посвящено гидрогелям на основе природных полимеров - биополимеров, и это связано с их биосовместимостью и способностью к биodeградации в организме без выделения токсичных соединений. Для получения стабильных гидрогелей вводят сшивающие реагенты в раствор полимера. В результате происходит гидратация в водной среде гидрофильных групп, находящихся в составе таких систем, а образование межмолекулярных сшивок предотвращает растворение полимера.

Биополимер хитозан (рисунок 1) обладает целым рядом уникальных свойств – таких как биосовместимость, способность к биodeградации, нетоксичность, сродство к белкам, кровоостанавливающие, противоопухолевые и фунгистатические свойства [3].

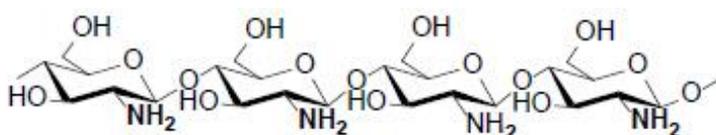


Рисунок 1 – Формула хитозана

Хитозан получают путем щелочного дезацетилирования биополимера хитина, который выделяют из панцирей ракообразных, скелетов насекомых и

некоторых грибов. Наличие доступных для модификации аминогрупп в макромолекуле хитозана является основной причиной, почему он обладает намного большим потенциалом по сравнению с хитином для использования в различных областях применения [1]. Широкий спектр потенциального применения хитозана включает медицину, доставку лекарств, очистку воды, также на его основе создают мембраны, гидрогели, адгезивы, антиоксиданты, биосенсоры и разрабатывают упаковку пищевых продуктов [4].

Способность хитозана растворяться в разбавленных водных растворах кислот, а также его волокно- и пленкообразующая способность, наряду с наличием в его составе реакционноспособных аминогрупп, облегчает модификацию полимера и его переработку в полимерные изделия. Пленки и волокна, полученные из таких растворов, водорастворимы, и для перевода хитозана из солевой формы в нерастворимую в воде форму полиоснования используют обработку растворами аммиака или щелочи, обеспечивающие депротонирование аминогрупп хитозана [3, 5, 6]. В результате такой обработки материал не только теряет растворимость в воде, но и влагоудерживающую способность. Кроме того, при pH ниже 4,0 хитозан по-прежнему растворяется в воде.

Для получения на основе хитозана нерастворимых материалов, но обладающих высоким набуханием в воде, используют бифункциональные реагенты. В их присутствии в растворах хитозана формируется трехмерная сетка геля, которая обеспечивает материалу не только высокую регулируемую влагоудерживающую способность, но и контролируемое высвобождение включенных в его структуру лекарственных веществ, обеспечивая их пролонгированное высвобождение. С целью модификации пленок и регулирования их свойств используют сшивающие реагенты ковалентного или ионного типа. В литературе такие гидрогели называют ковалентными или ионными (рисунок 2). Оба типа реагентов имеют ряд преимуществ и недостатков, однако выбор того или иного сшивающего реагента зависит от

назначения разрабатываемого материала, желаемой формы и ключевых свойств.

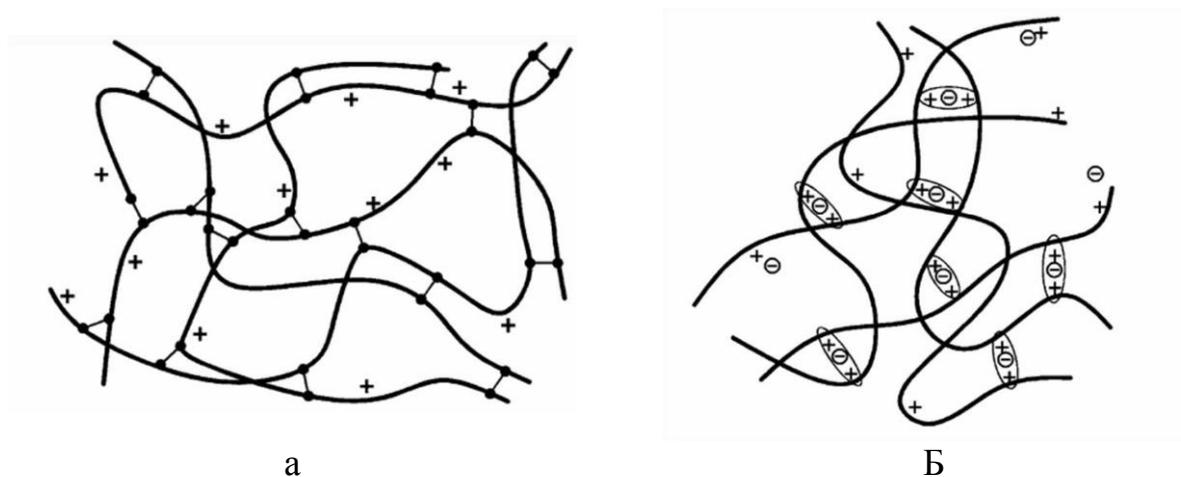


Рисунок 2 – Схематическое изображение гидрогелей ковалентного (а) или ионного (б) типа.

В последующих главах будут рассмотрены закономерности взаимодействия с хитозаном сшивающих реагентов различной химической природы и происхождения и влияние условий сшивки хитозана на комплекс свойств полученных гидрогелевых материалов.

Подавляющее большинство известных работ направлено на получение и исследование полимерных материалов на основе хитозана, модифицированного диальдегидами, чаще всего глутаровым альдегидом (ГА) [7, 8]. Однако в целом ряде работ указывается на токсичность продуктов взаимодействия хитозана и ГА, что является препятствием для их применения в биомедицинских целях [9-12]. Вследствие низкой токсичности ионные сшивающие реагенты все чаще используют как альтернативу ковалентной сшивке.

## **1.2 Получение гидрогелей с использованием ионных сшивающих реагентов**

Техника ионотропного гелеобразования - это чрезвычайно простой и мягкий способ получения гидрогелей. Например, хитозановые частицы, нерастворимые во всем диапазоне рН, могут быть получены путем простого добавления раствора хитозана по каплям в раствор триполифосфата (ТПФ)

[13]. Помимо этого процесс ионного гелеобразования легко контролируемый (происходит помутнение раствора) и не требует использования органических растворителей. Хорошие перспективы применения ионно-сшитых хитозановых гидрогелей определяются еще и тем, что в используемых концентрациях сами ионные сшивающие реагенты, как правило, нетоксичны [14].

Одним из условий образования ионной связи в результате взаимодействия хитозана с ионным сшивающим реагентом является наличие в макромолекуле полимера положительно заряженных протонированных аминогрупп и как минимум двух отрицательно заряженных групп в молекуле сшивающего реагента [14]. Хитозан является поликатионом, поэтому его легко можно модифицировать с помощью ионных сшивающих реагентов (анионов или полианионов) за счет электростатических взаимодействий [15].

Стоит отметить, что в отличие от взаимодействий в полиэлектролитных комплексах, которые по своей природе схожи со сшивкой ионными сшивающими реагентами, молекулярная масса сшивающего реагента значительно меньше молекулярной массы хитозана. Целый ряд работ посвящен изучению и исследованию особенностей сшивки хитозана с помощью различных ионных сшивающих реагентов. Выбор сшивающего реагента влияет на свойства получаемых материалов, а соответственно и области применения. На сегодняшний день для сшивки хитозана используют всего несколько типов низкомолекулярных полианионов, среди которых наиболее часто встречаются полифосфаты [16-19]. ТПФ (рисунок 3) – широко известный и наиболее часто использующийся полифосфат, может формировать гель с хитозаном за счет электростатических взаимодействий с образованием ионно-сшитой сетки [20]. Благодаря низкой токсичности и высокой скорости гелеобразования, сшивка хитозана ТПФ позволяет получать нано- и микрочастицы на основе хитозана для систем с контролируемой доставкой лекарств [21-25], избегая при этом нежелательных побочных эффектов.

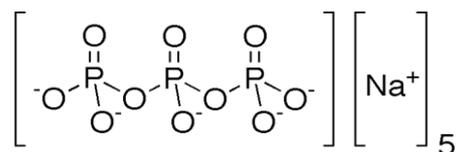


Рисунок 3 – Формула ТПФ ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ )

Помимо получения наночастиц, ТПФ также часто используют для получения нерастворимых в воде хитозановых пленок или мембран биомедицинского назначения путем поверхностной модификации исходных материалов. Так, например, были разработаны пленочные материалы путем погружения готовых хитозановых пленок в раствор ТПФ различной концентрации. В состав пленок включали различные лекарственные вещества: зидувин [26], рибофлавин или кумасси бриллиантовый синий R-250 [16], лидокаин [20], а также противоопухолевый препарат 5-фторурацил и противовоспалительный препарат индометацин [19], придавая тем самым различные свойства, необходимые для использования в биомедицинских целях.

Помимо ТПФ также используют и фосфаты с меньшим числом функциональных групп, которые соответственно проявляют различную реакционную способность. В работе [16] были использованы несколько видов мультивалентных фосфатов, таких как триполифосфат, пирофосфат (ПФ) ( $\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2$ ) и фосфат ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) для сшивки хитозана. Свойства ионно-сшитых пленок в значительной степени зависели от электростатических взаимодействий между различными анионами и хитозаном. Молекулярная структура мультивалентного фосфата сильно влияла на взаимодействие с хитозаном. Большое число отрицательно заряженных групп в ТПФ и в ПФ обеспечивало их лучшую способность сшивать хитозан, по сравнению с фосфатом. Пленки, сшитые ТПФ и ПФ, были получены путем погружения хитозановых пленок в соответствующие растворы сшивающих реагентов. Набухание пленок из хитозана, сшитых ПФ, сильнее зависело от pH по сравнению с набуханием пленок, обработанных ТПФ, а выделения лекарств происходило с более высокой скоростью [16].

ПФ также как и ТПФ используют не только для получения пленок, но и наночастиц на основе хитозана. При этом образование частиц происходит только при определенной концентрации ПФ [27]. Отмечается, что в отличие от наночастиц, сшитых ТПФ, который сразу коагулирует и осаждает хитозан, хитозановые наночастицы, сшитые ПФ, сохраняются коллоидно-стабильными даже при высоких концентрациях ПФ. Взаимодействие хитозана с ПФ приводит к образованию наночастиц, чьи размеры могут быть заранее заданы путем варьирования концентрации исходного раствора хитозана [27].

Помимо фосфатов для ионного сшивания хитозана используют и другие анионы. Мультивалентный низкомолекулярный ион – цитрат натрия – также достаточно часто используют для сшивки хитозана. В результате взаимодействия между хитозаном и цитратом в водном растворе немедленно происходит ионная сшивка хитозана, формируя при этом гелевые частицы. Авторами работы [28] были получены лекарственно-наполненные хитозановые частицы с использованием цитрата натрия. Было установлено, что увеличение концентрации хитозана (до 4%) и уменьшение содержания цитрата натрия (до 0,1 моль/л), а также выбор рН раствора цитрата натрия (6,0) приводит к замедлению высвобождения лекарств. Цитрат натрия также использовали для получения рН-чувствительных хитозановых пленок для контролируемого выделения лекарственных средств в заданном отделе ЖКТ [29]. Турбидиметрическое титрование показало, что существуют взаимодействия между цитратом и хитозаном в области рН 4,3-7,6, число которых зависит от степени ионизации функциональных групп. Пленки были получены обычным погружением в раствор цитрата натрия. Набухание зависело от рН и ионной силы раствора. Было установлено, что концентрация цитрата натрия, а также рН во время сшивки также влияют на набухание пленок и профили высвобождения лекарств из сшитых хитозановых пленок. Эти данные нашли

подтверждение в работе [30] при использовании в качестве лекарственных веществ 5-фторурацила и индометацина.

Возможные электростатические взаимодействия между противоположно заряженными лекарствами (инсулин и бензойная кислота) и хитозаном были исследованы в работе [31]. Сшивающий реагент ТПФ был добавлен, чтобы сформировать микро/наночастицы или усилить формирование частиц. В работе установлено, отсутствие взаимодействия между бензойной кислотой и хитозаном, и возможно слабое взаимодействие между инсулином и хитозаном. Большая часть инсулина была адсорбирована на хитозане или физически захвачена во время формирования микрочастиц. Результаты показали, что большие молекулы, такие как инсулин, так же как и маленькие, как бензойная кислота, не связываются за счет ионных взаимодействий с хитозаном. Их включение в хитозановые нано/микрочастицы осуществляется в основном за счет физического инкапсулирования, адсорбции [31].

Гомогенная термообратимая гелевая система была получена за счет нейтрализации высоко дезацетилированных полуразбавленных хитозановых растворов с  $\beta$ -глицерофосфатом (рисунок 4) [32]. Введение глицерофосфата увеличивает рН хитозана до нейтрального значения и приводит к формированию гелеподобной структуры при повышении рН больше 6,2. В работе показано, что увеличение температуры в значительной степени влияло на электропроводность и рН, а также установлено, что гидрофобные взаимодействия являются основными движущими силами для образования геля хитозана при высокой температуре в присутствии глицерофосфата [32].

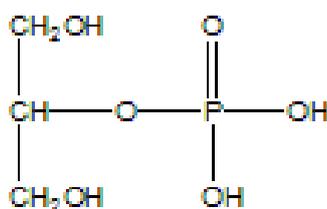


Рисунок 4 – Формула  $\beta$ -глицерофосфата

На степень модификации хитозана при его сшивании реагентами, содержащими ионогенные группы, влияет молекулярная масса поливалентного иона. Авторами работы [33] были получены мембраны на основе хитозана, сшитые с помощью низкомолекулярных компонентов – ТПФ и цитрата натрия, а кроме того, высокомолекулярного компонента альгината натрия. На рисунке 5 представлена структура ионных сшивок между аминогруппами хитозана и сшивающими реагентами.

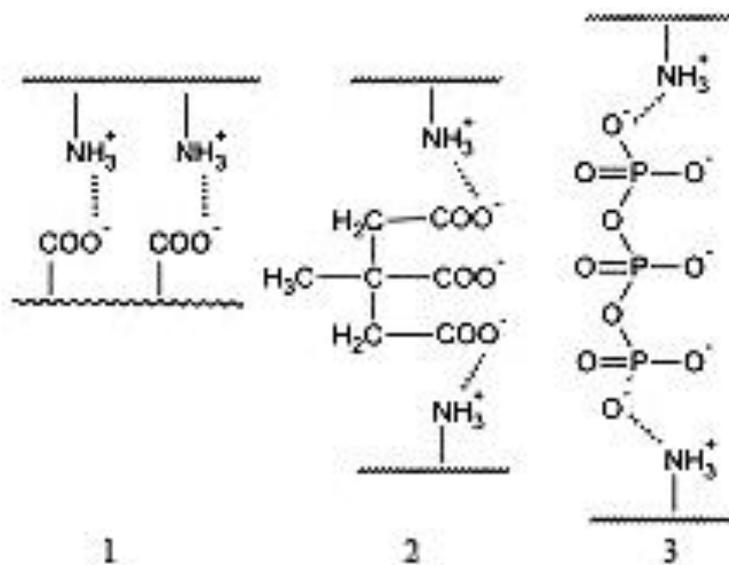


Рисунок 5 – Структура ионных сшивок между аминогруппами хитозана и отрицательно заряженными группами сшивающих реагентов:

1 – альгинат, 2 – цитрат, 3 – ТПФ [33].

Было обнаружено, что плотность сшивки хитозановых мембран сильно зависит от типа ионного сшивающего реагента и условий получения мембран. Плотность сшивки возрастала при использовании сшивающих реагентов в следующем порядке: ТПФ с рН 9,0, альгинат натрия, цитрат натрия, ТПФ с рН 5,5 [33].

В работе [34] хитозановые наночастицы с низкомолекулярным гидрофобным лекарственным соединением куркумином были получены с помощью декстран сульфата (рисунок 6). Декстран сульфат был выбран с целью устранения недостатков, проявляющихся при использовании ТПФ: плохие механические свойства наночастиц и растворимость в кислых условиях, что

ограничивает применение в фармацевтической области, особенно при пероральной доставке лекарств [35]. Полученные в работе [34] куркумин-наполненные наночастицы могут быть перспективны при использовании в раковой терапии. Декстран сульфат натрия – биосовместимый полианионный полимер, широко используемый в медицинской области в системах доставки лекарств. Он часто сам используется как лекарственное средство, благодаря его способности стимулировать иммунитет и бороться с различными вирусами [36, 37]. Наночастицы формируются за счет электростатических взаимодействий между хитозаном и декстраном сульфата. Поверхностный заряд изменяется за счет изменения концентрации двух полимеров и pH. Полученные наночастицы обладают хорошей стабильностью и не нуждаются в стабилизации или дополнительных сшивающих реагентах. Полученные наночастицы имеют сферическую форму с отрицательным дзета потенциалом и хорошую коллоидную стабильность [34].

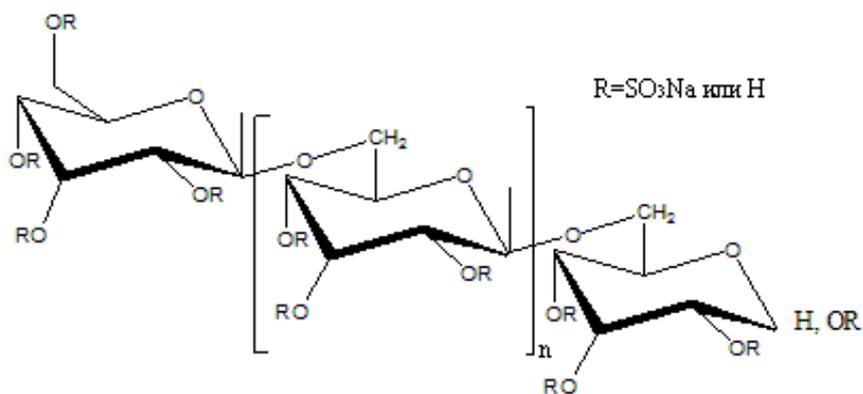


Рисунок 6 – Формула декстран сульфата

В работе [38] были получены наночастицы из хитозана и поли-γ-глутаминовой кислоты за счет простого ионного гелеобразования для оральной доставки инсулина. Поли-γ-глутаминовая кислота – анионный пептид, природный компонент, производится главным образом путем выращивания микроорганизмов, например, штаммов рода *Bacillus*. К основным ее достоинствам относят водорастворимость, нетоксичность и относительную неиммуногенность. В данном исследовании получение наночастиц из низкомолеку-

лярного хитозана и глутаминовой кислоты осуществляли путем добавления водного раствора кислоты по каплям к раствору хитозана при различных концентрациях. Наночастицы были получены за счет ионного взаимодействия между положительно заряженным хитозаном и отрицательно заряженной кислотой. Диаметры полученных наночастиц были в диапазоне 110-150 нм и имели отрицательный или положительный дзета потенциал, в зависимости от концентрации хитозана и поли- $\gamma$ -глутаминовой кислоты [38].

Ионную сшивку хитозана с использованием высокомолекулярных природных соединений, содержащих отрицательно заряженные группы, можно рассматривать как образование полиэлектролитных комплексов. Этому вопросу на примере разных полиэлектролитов посвящен целый ряд обзоров [39-43], поэтому он не будет здесь подробно рассматриваться.

### **1.2.1 Изучение условия получения материалов на основе ионных гелей хитозана**

Плотность сшивки является основным параметром, влияющим на важнейшие свойства сшитых полимерных материалов, таких как растворимость, механическая прочность, степень набухания и скорость высвобождения лекарственных веществ. За счет изменения плотности сшивки и гидрофильных свойств сшитого хитозана можно регулировать скорость выделения включенных в состав пленок биологически активных веществ и тем самым программировать свойства полученных материалов. Поэтому для получения материалов с заданной степенью сшивки необходимо определить условия взаимодействия функциональных групп полимера и сшивающего реагента (рН, концентрация раствора хитозана, концентрация раствора сшивающего реагента, молекулярная масса хитозана и др.).

Выделяют два основных способа получения ионно-сшитых гидрогелей хитозана: путем простого погружения хитозановой пленки или гранулы в раствор сшивающего реагента [16, 20] или путем смешивания растворов хи-

тозана и сшивающего реагента при определенных соотношениях [24, 44]. Последний метод приводит к получению наноразмерных частиц [14, 45, 46]. При получении частиц большего размера путем формирования микрокапсулы из капли раствора хитозана в среде сшивающего реагента на поверхности образуется слой высоко сшитого полимера, который ингибирует диффузию сшивающего агента к ядру [47- 50]. При этом, чем меньше размер молекулы сшивающего реагента, тем быстрее формируется капсула [50]. Условия проведения реакции ионотропного гелеобразования определяют свойства получаемых материалов.

При рассмотрении влияния условий получения ионно-сшитых материалов на основе хитозана на свойства разрабатываемых материалов, необходимо иметь представление о механизме взаимодействия хитозана с ионным сшивающим реагентом, который в значительной степени зависит от значения рН растворов сшивающих реагентов. Было показано [51], что в кислой среде (рН 3,0) присутствуют только фосфатные ионы, в то время как в щелочной среде (рН 9,0) присутствуют как ОН-ионы, так и фосфатные ионы, которые могут конкурировать друг с другом при взаимодействии с аминок группами хитозана. В связи с чем, авторы [51] утверждают, что при более низких рН происходит ионная сшивка с ТПФ, в то время как при высоких значениях рН происходит реакция депротонирования хитозана (рисунок 7).

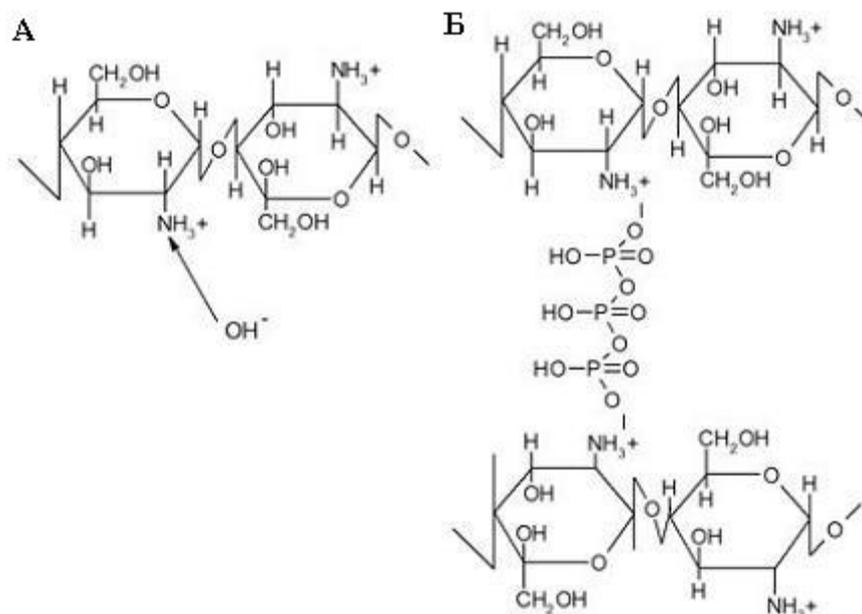


Рисунок 7 – Два варианта взаимодействия хитозана с ТПФ: (А) депротонирование, (Б) ионное сшивание [51]

При изучении влияния рН на плотность ионной сшивки на примере наночастиц, сшитых ТПФ или полифосфатом [21], было показано, что более кислые значения рН ( $\text{pH} < 6$ ) приводят к более плотной сшивке хитозановых частиц, в отличие от рН 8,6. Плотность сшивки хитозановых материалов определяет такие важные свойства, как влагопоглощение и кинетику выделения лекарственных средств. Было показано [21], что степень набухания закономерно снижалась с увеличением плотности сшивки при изменении рН среды до более кислых значений. При этом полученные частицы показали рН-зависимое набухание и выделение лекарственных соединений [21]. Данные закономерности также справедливы при получении пленочных материалов, сшитых ТПФ при разных рН (3,0 и 9,0), которые также как и частицы показали рН-зависимое набухание в воде [51].

Кроме влагопоглощающей способности, рН растворов сшивающих реагентов оказывает влияние и на физические характеристики получаемых материалов. Авторы работы [23] исследовали влияние рН раствора ТПФ на морфологию частиц и выход теофиллина из микрочастиц хитозана. Для исследований были выбраны три значения рН: 4,0, 5,0 и 6,0. Результат показал,

что микрочастицы, сшитые ТПФ при рН 6,0, имели наиболее правильную сферическую форму и гладкую поверхность, а кинетика выделения теофиллина показала наиболее пролонгированное его выделение.

В работе [46] исследовано влияние рН, молекулярной массы хитозана (50 и 100 кДа), концентрации хитозана (0,5-2,5 мг/мл) и соотношения хитозан:ТПФ (3:1 – 15:1) на степень дисперсности получаемых наночастиц. Было установлено, что на размер частиц оказывали влияние все параметры получения, однако наибольшее влияние на размер оказывала концентрация хитозана. Управление этими параметрами дает возможность для манипулирования условиями процесса и оптимизации процесса получения наночастиц в зависимости от областей применения [46].

Влияние таких параметров, как молекулярная масса хитозана, концентрация исходных растворов полимера и сшивающего реагента, время сшивки, температура на свойства разрабатываемых материалов описаны в целом ряде работ [20, 52- 55]

С целью изучения возможности продлить анестезирующий эффект лидокаина в оральной доставке авторы работы [20] получали пленки с лидокаином при трех различных молекулярных массах хитозана (150, 400 и 600 кДа) с концентрациями 1-3%, и затем обрабатывали ТПФ с различными концентрациями (0,1 и 0,3%). Время сшивки составляло всего 5 минут. Увеличение концентрации хитозана стало причиной снижения биоадгезии, в то время как увеличение его молекулярной массы не оказывало значительного влияния на этот параметр. Увеличение концентрации и молекулярной массы хитозана увеличивало скорость выделения и количество выделившегося лекарственного вещества, в то время как увеличение концентрации ТПФ снижало эти показатели [20].

Влияние концентрации исходных растворов полимера и сшивающего реагента ТПФ на свойства наночастиц и скорость выделения лекарственных соединений было также исследовано в работе [54]. С целью определения оп-

тимального соотношения исходных компонентов использовали различные концентрации хитозана (0,2%, 0,3%, 0,4%). Для получения наночастиц различные количества 0,5%-ного раствора ТПФ добавляли в хитозановый раствор по каплям. Для получения стабильных наночастиц в ходе работы были оптимизированы условия получения. Увеличение количества ТПФ, а соответственно снижение соотношения хитозан/ТПФ приводило к увеличению мутности, свидетельствующему об изменении размера частиц к большему диапазону. После исключения образцов с соотношениями хитозан/ТПФ, при которых происходила агрегация наночастиц, было выбрано оптимальное соотношение хитозан/ТПФ 0,4/0,095, которое обеспечивало высокую эффективность включения лекарственного вещества (70%) и средний размер частиц 247 нм. Это соотношение было выбрано в дальнейшем для введения в состав частиц л-аспарагиназы II. Выделение лекарственного вещества в большой степени зависело от pH и ионной силы среды [16].

Целью работы [55] было исследовать влияние основных свойств хитозана (молекулярная масса и степень ацетилирования), pH и ионной силы раствора на физические свойства наночастиц, хитозана, сшитого ТПФ, и их стабильность. Для исследований был выбран хитозан с молекулярными массами 120 и 10 кДа и степенью ацетилирования 1,4-56%. Наночастицы были сформированы быстрым смешиванием 1 мл ТПФ с 3 мл хитозана в уксусной кислоте при комнатной температуре [55]. Из микрофотографий образцов хитозана с различными молекулярными массами и степенью ацетилирования видно, что наночастицы, полученные из низкомолекулярного хитозана (10 кДа) (рисунок 8а) более плотные и компактные, чем полученные из высокомолекулярного хитозана (120 кДа) при одинаковой степени ацетилирования (рисунок 8б). Увеличение степени ацетилирования приводит к дальнейшему росту частиц (рисунок 8в) [55]. Влияние степени ацетилирования на размер частиц проиллюстрировано на рисунке 9.

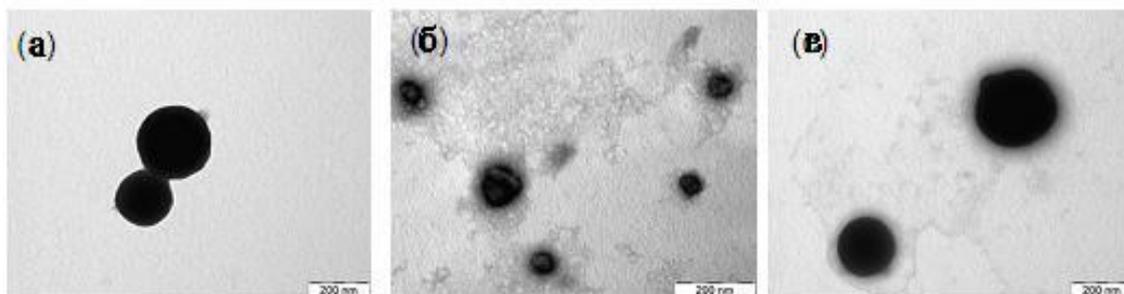


Рисунок 8 – Микрофотографии наночастиц хитозана, сшитых ТПФ, полученных в разных условиях: а – ММ 10 кДа, степень ацетилирования 10%, б – ММ 120 кДа, степень ацетилирования 10%, в – ММ 10 кДа, степень ацетилирования 60% [55]

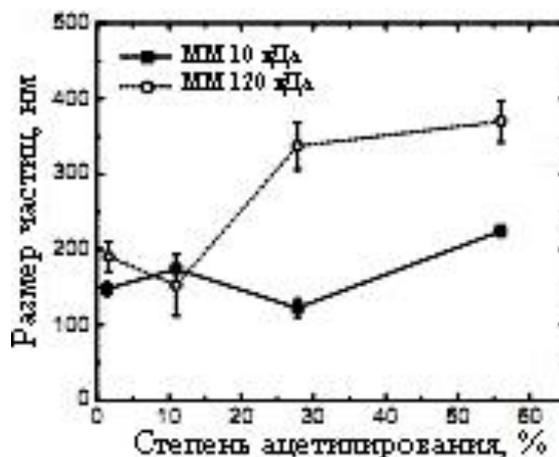


Рисунок 9 – Влияние степени ацетилирования на размер наночастиц хитозана, сшитых ТПФ при разных молекулярных массах [38].

В работе [56] было исследовано влияние различных параметров, таких как концентрация сшивающего реагента глицерофосфата, температура раствора и степень дезацетилирования хитозана на время гелеобразования в его растворах. Хитозановые гидрогели, сшитые глицерофосфатом, были получены путем растворения различного количества хитозана и динатриевой соли глицерофосфата в уксусной кислоте (0.1M). Полученные результаты показывают, что увеличение температуры, концентрации и степени дезацетилирования хитозана способствуют формированию геля и снижают время гелеобразования.

При включении в состав частиц на основе хитозана ферментов также очень важно правильно подобрать условия получения материалов. Так, например, фермент лакказы, который очень чувствителен к сшивающему реагенту, может быть легко инкапсулирован в микрочастицы, полученные методом распылительной сушки, благодаря которому реализуется минимальное время контакта двух компонентов [35]. Кроме того распылительная сушка технологически выгодна, так как она может быть запущена в непрерывном процессе. При выбранных условиях (130<sup>0</sup>С) лакказы была успешно инкапсулирована в хитозановые частицы, сшитые триполифосфатом натрия, сохраняя при этом 80% своей ферментативной активности. Было также исследовано влияние сшивающего реагента и показано, что, несмотря на затрудненную диффузию, эти ограничения были не значительны. При выбранной концентрации хитозана (1%) ферментативная активность лакказы была даже выше, чем из не сшитых частиц. Оптимальными для получения хитозановых микрочастиц с иммобилизованной лакказой оказались: температура сушки 130<sup>0</sup>С, концентрация хитозана 1%, соотношение сшивки 0,047. В этих условиях, активность фермента остается на высоком уровне, а частицы стабильны.

Таким образом, основными методами получения материалов ионно-сшитого хитозана и иммобилизации лекарственных соединений является поверхностная модификация пленок и гранул разного размера или формирование наночастиц при смешении разбавленного раствора хитозана и полифосфата.

### **1.2.2 Материалы медицинского назначения на основе хитозана, сшитого ионными сшивающими реагентами. Системы с контролируемым выделением лекарственных веществ.**

В зависимости от особенностей осуществления ионной сшивки, выбора ионного сшивающего реагента, условий получения, есть возможность полу-

чать самые разнообразные материалы медицинского назначения: спонжи, гели, волокна, частицы, матрицы.

Водорастворимый биосовместимый и биodeградируемый полимер хитозан применяют при биоинкапсулировании в виде гидрогелевых нано- и микрочастиц и капсул или полимерных пленок, содержащих биоматериалы (ферментами, белками, антибиотиками, ДНК, гормонами и др.), а также живые клетки (микроорганизмы, растительные и животные) [23, 57, 58]. Хитозан лежит в основе полимерных покрытий, содержащих различные терапевтические агенты (антибиотики, ферменты, антиоксиданты) для лечения ран, лекарства с пролонгированным высвобождением, ДНК-содержащие носители для получения генетически модифицированных клеток [35, 59].

Интересным и перспективным направлением использования материалов на основе хитозана, сшитых ионными сшивающими реагентами, является тканевая инженерия, целью которой является регенерация поврежденных или утраченных тканей, а также целых органов путем использования новых биоматериалов и клеточных технологий [60,61]. Неотъемлемой частью тканевой инженерии является разработка оптимального биodeградируемого полимерного каркаса – скаффолда (матрикса), обеспечивающего адгезию и пролиферацию клеток, который должен постепенно замещаться формирующимися тканями или органами [62, 63]. Основные требования, которые предъявляются к полимерным скаффолдам – это биосовместимость, морфологическая структура с крупными порами, поддерживающая миграцию, хорошую адгезию и последующую жизнедеятельность клеток, а также комплекс таких необходимых механических и физико-химических свойств, как способность к набуханию в воде, упругость, атравматичность, адгезионные характеристики [64]. Всем этим требованиям отвечают материалы на основе хитозана, а ионная сшивка при соблюдении определенных условий позволяет перево-

дить материалы в нерастворимое состояние, сохраняя влагопоглощающую способность.

На основе системы раствор хитозана - сшивающий реагент пористые структуры с системой взаимопроникающих пор могут быть получены путем замораживания и лиофилизации полимерного гидрогеля [62, 63, 65,]. При этом характеристики исходной системы определяют структуру полученного матрикса (характер и распределение пор по размерам), а также степень адгезии и расплывания клеток, которые, в свою очередь, определяют их последующий рост и пролиферацию.

В работе [63] получали пористые хитозановые спонжи с диаметром пор 100-200 мкм методом лиофильной сушки для выращивания клеток. В качестве сшивающего реагента использовали ТПФ. Целью работы было разработать хитозановые спонжи типа скаффолдов для выращивания остеогенных клеток для их использования в формировании костной ткани. Гистологические исследования подтвердили образование костной ткани в спонже. Полученные результаты показали, что хитозановые спонжи могут быть эффективно использованы в качестве скаффолдов для тканевой инженерии при формировании костной ткани *in vitro* и трансплантации остеогенных клеток для регенерации костной ткани *in vivo*.

Как правило, когда раствор ТПФ смешивают с хитозаном, ТПФ быстро взаимодействует с аминогруппами хитозана, что приводит к образованию неоднородной системы, а также наночастиц или неконтролируемых агрегатов в зависимости от концентрации хитозана и ТПФ. Неоднородность приводит к неровной структуре гидрогелей и выраженной анизотропии механических свойств в макроскопических масштабах, таким образом, ограничивая свой потенциал и конечное применение. Для получения однородных гидрогелей хитозана с помощью ТПФ необходимо использовать специальные методы и приемы. Новый способ получения полисахаридных скаффолдов в форме гелей на основе хитозана и ТПФ был разработан авторами работы

[62]. Метод предусматривает введение ТПФ в высоковязкий раствор хитозана за счет медленной диффузии с контролируемым гелеобразованием (рисунок 10), низкая скорость диффузии достигалась использованием специальной мембраны. Закрытый вязкий раствор хитозана помещают в наружный раствор ТПФ при перемешивании. Во время диализа ТПФ ионы диффундируют через полупроницаемые мембраны, и после 24 ч вязкий раствор переходил в однородный гидрогель (рисунок 10Б). Готовые образцы подвергали сублимационной сушке в течение 24 ч.

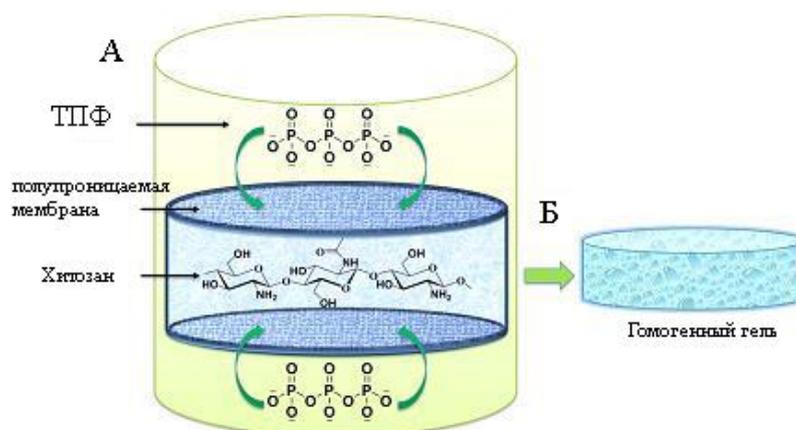


Рисунок 10 - Экспериментальная установка для разработки хитозан-триполифосфат гидрогеля, с использованием техники диализа

Данный способ позволил получить биополимерные сетки, которые продемонстрировали отсутствие цитотоксичности, благодаря чему могут быть использованы в различных областях применения: раневые повязки (местного назначения, в частности, в сочетании с антибактериальными препаратами или наночастицами серебра), тканевая инженерия (для лечения суставных хрящей), а также доставка лекарственных средств [62].

В работе [66] были получены бездефектные нановолокна диаметром 78 нм на основе смеси хитозана с полиэтиленоксидом (4:1), полученные методом электроформования. Архитектурная стабильность нановолокнистой сетки в водной среде была достигнута за счет ионотропной сшивки хитозана с ТПФ ионами. Нетоксичность, а также способность к набуханию (до 300%) и биodeградация (40% за 30 дней) полученных нановолокон предопределили

успешность использования их в качестве матриц для тканевой инженерии для реконструкции базальной мембраны кожи [66].

Таким образом, применение биосовместимого и биоразлагаемого полимера хитозана наряду с правильно подобранными условиями сшивки создают перспективы получения эффективных матриц для тканевой инженерии. Однако среди множества направлений применения ионно-сшитых материалов на основе хитозана, наибольшее распространение получила все же разработка систем с контролируемым выделением лекарственных средств. Основным фактором, ограничивающим применение хитозана в доставке лекарств, является способность распадаться в физиологических средах и быстрое набухание в кислой среде, ведущее к мгновенному высвобождению введенного лекарства [67]. Модификация путем ионного сшивания позволяет не просто перевести хитозан в нерастворимое состояние, но сохранить высокую влагоудерживающую способность, которая влияет на высвобождение лекарственного вещества из гидрогелей [58]. Кроме того, как правило, все материалы, сшитые ионными сшивающими реагентами, проявляют рН-чувствительное набухание и выход лекарств за счет диффузии через их пористую структуру [50, 68], что позволяет использовать получаемые материалы в качестве направленной доставки лекарств в медицине. Как правило, для данных целей гидрогели изготавливают в виде пленок [16, 20, 69], капсул, таблеток [58], микросфер [64, 70] и наночастиц [54, 57, 71], которые должны обладать влагоудерживающей способностью и обеспечивать эффективное выделение введенного лекарственного соединения. При этом было обнаружено, что наночастицы хитозана по сравнению с микросферами имеют большую способность проникать в эпителий. Благодаря легкой доступности наночастиц, они могут свободно транспортироваться в различные участки тела. Скорость выделения лекарственного средства из таких систем можно контролировать, и тем самым увеличивать продолжительность терапевтического эффекта [68].

Потенциальное использование полимерных наночастиц как носителей лекарств привело к разработке множества подобных систем, основные преимущества которых лежат в их способности беспрепятственно проходить биологические барьеры, защищая включенные соединения (пептиды, белки) от деградации в биологических средах с последующим направленным выделением [70]. Целый ряд работ посвящен созданию наночастиц для контролируемой доставки лекарств [27, 54, 57, 72, 73].

Авторы работы [57] разработали специальные наноконплексы на основе хитозана, сшитые ТПФ, с липосомальным покрытием для доставки витамина Е с целью улучшить стабильность витамина Е во время хранения и нагревания. Было показано, что полученные наноконплексы могут значительно улучшить срок годности витамина Е и термостойкость, что позволяет расширить области его применения.

В некоторых случаях введение лекарственного вещества не только придает лечебные свойства материалу, но и способствует формированию и стабилизации разрабатываемых наночастиц. В работе [54] авторы показали, что при введении протеина Л-аспарагиназы II в раствор хитозана происходит ионотропное взаимодействие между положительно заряженным хитозаном и отрицательно заряженными аспарагиназой и ТПФ. Отрицательно заряженный белок мог связываться с хитозаном электростатически при рН 5,7 еще до введения ТПФ. Таким образом, фермент не только не мешал формированию хитозановых наночастиц, но также способствовал их формированию и увеличивал стабильность. Было показано, что с увеличением концентрации белка от 1 до 4 мг/мл размер частиц увеличивался на 36%, а выделение фермента имело рН-зависимый характер [54].

Для пероральной доставки инсулина были разработаны наночастицы на основе хитозана и поли- $\gamma$ -глутаминовой кислоты, полученные за счет ионного гелеобразования [38]. Введение инсулина не влияло на форму частиц, а профили высвобождения инсулина в значительной степени зависели от рН

среды. Высвобождение инсулина из тестируемых наночастиц были исследованы при значениях pH: 2,5, 6,6, 7,4, которые имитировали pH среды желудка, двенадцатиперстной кишки, и pH крови, соответственно. При pH 2,5, количество выделившегося инсулина составило около 20% в течение часа. При pH 6,6 количество высвободившегося инсулина было минимальным. При pH 7,4, напротив, наночастицы были нестабильными и распадались, в результате чего выделение инсулина происходило достаточно быстро. Эти результаты свидетельствуют о том, что стабильность наночастиц в различных средах pH значительно влияет на скорость высвобождения инсулина [38, 74].

Авторы работы [25] создали систему доставки ацикловира в кожу на основе хитозановых наночастиц, сшитых ТПФ. Целью работы было улучшить проницаемость ацикловира через кожу, повышение химической стабильности ацикловира путем включения в наночастицы и охарактеризовать физико-химические свойства новой системы доставки. Полученные результаты показали, что введение ацикловира в наночастицы значительно улучшает его химическую стабильность. Более того, исследования диффузии в кожу *in vitro* показали улучшенное проникновение ацикловира из наночастиц через эпидермис, особенно из наночастиц с более высоким содержанием хитозана [25].

Обнаруженное ускорение диффузии ацикловира из более крупных частиц может быть связано со взаимодействиями между положительно заряженными наночастицами с отрицательно заряженными компонентами эпителиальной клеточной поверхности. Поверхностная плотность заряда больших наночастиц может привести к более сильному взаимодействию с клеточной поверхностью, в результате чего диффузия ацикловира лучше [25].

Известно, что наночастицы – это универсальные системы доставки, которые, как правило, используют для доставки небольших молекул препарата, терапевтических пептидов и белков, антигенов, ДНК-олигонуклеотидов

внутривенно, перорально или через слизистую. Гидрогели же – это другой перспективный класс систем доставки для биомедицинских применений. Они содержат лишь небольшие количества полимерного материала (1-20% в водном растворителе), имеют высокую молекулярную проницаемость, низкое межфазное натяжение и механические свойства, которые напоминают физиологические мягкие ткани [75]. Авторы работы [76] сравнили хитозановые наночастицы и гидрогели для доставки белкового антигена овальбумина. Наночастицы были получены за счет взаимодействия хитозана с сульфатом натрия. Связанный белок выходил медленно, менее чем 50% было высвобождено из наночастиц после 10 дней инкубации *in vitro*. Во второй части исследования получали инъекционный термочувствительный гидрогель хитозана. Лекарственное соединение было включено в раствор хитозана перед гелеобразованием. Выход белка из хитозанового геля *in vitro* был еще медленнее, чем из наночастиц, через 10 дней менее вышло 10% [76].

Для пероральной доставки лекарственных веществ через слизистую оболочку наиболее подходящая форма полимерного материала – это пленки. Так, например, с целью пролонгирования анестезирующего эффекта лидокаина при обработке слизистой оболочки ротовой полости были получены пленочные материалы на основе хитозана, сшитые ТПФ (0,1% и 0,3%). Благодаря биоадгезивным свойствам, хитозановая пленка хорошо удерживалась в ротовой полости, и выход лекарства происходил в течение длительного периода, тем самым увеличивая терапевтический эффект [20].

В работе [16] также были получены лекарственно-наполненные пленочные материалы на основе хитозана. Было показано, что молекулярная структура мультивалентных фосфатов, использованных в качестве сшивающих реагентов, сильно влияла на взаимодействия с хитозаном. Пленки показали хорошие результаты по набуханию и выделению включенных лекарственных соединений (кумасси бриллиантовый синий и рибофлавин), которые выделялись быстро в кислых условиях, в то время как в нейтральной сре-

де наблюдалось пролонгированное выделение. По сравнению с пленками, сшитыми ТПФ, использование ПФ позволило получить пленки с намного более рН-чувствительным набуханием и контролируемым выходом лекарств из-за их относительно слабых взаимодействий. Такие пленки могут быть многообещающими для использования в специфической доставке ионно-специфических частиц в желудок [16].

Основной недостаток ионных сшивающих реагентов связан с высокой скоростью образования ионных связей (фактическим отсутствием кинетических стадий, предшествующих фазовому разделению в системе). Это создает необходимость применения специальных приемов при проведении сшивки, особенно, если речь идет о получении гидрогеля. Полученные материалы имеют недостаточную механическую стабильность, высок риск разрушения системы, из-за высокого рН-чувствительного набухания [50]. Использование ковалентных сшивающих реагентов может устранить эти ограничения.

### **1.3 Получение гидрогелей хитозана с использованием сшивающих реагентов ковалентного типа**

#### **1.3.1 Основные аспекты ковалентной сшивки**

Химическая модификация хитозана необходима для управления свойствами полимера с целью удовлетворения конкретных требований к материалу, учитывая широкий спектр возможных применений гидрогелей. Модификация ковалентными сшивающими реагентами позволяет регулировать растворимость, фармакодинамические свойства, способность взаимодействовать с другими веществами и др. [2, 18].

Ковалентная сшивка приводит к образованию стабильной пространственной сетки полимера, обеспечивая свободную диффузию воды и упругие свойства гидрогеля. И главное: метод позволяет, простым варьированием состава гелеобразующей композиции и условий сшивки изменять длительность процесса, предшествующего гелеобразованию в системе, что является важным условием завершения технологических операций по получению матери-

алов разной физической формы. Благодаря этим важным свойствам гелеобразующие системы, содержащие бифункциональные реагенты ковалентного типа, перспективны для создания систем контролируемого выделения лекарственных соединений: гидрогелей, пленок, волокон, микрокапсул, нановолокнистых материалов и высокопористых биополимерных матриц для культивирования клеток или скаффолдов в тканевой инженерии и заместительной хирургии [50, 61]. Свойства гидрогелей хитозана, надмолекулярная и пористая структура, степень набухания и механическая прочность могут варьироваться за счет изменения условий сшивки [61, 77].

Анализ литературных данных показал, что для химической сшивки хитозана используют большое число ковалентных сшивающих реагентов: ГА, дженипин, глиоксаль, декстран сульфат, окисленный циклодекстрин, этиленгликольдиглицерилэфир, диизоцианат и формальдегид [18, 61, 78, 79]. Выбор определенного сшивающего реагента обусловлен назначением разрабатываемого материала. Так, например, формальдегид – это дешевый многотоннажный продукт, однако вследствие высокой токсичности применение его целесообразно лишь при получении изделий технического назначения [8].

Авторы работы [80] разработали гидрогели хитозана, сшитые формальдегидом, которые могут быть использованы в качестве абсорбента с высокой поглощающей способностью. Гидрогели обладали достаточно высокой степенью набухания в диапазоне 2066-3306% и равновесным содержанием воды 95-97% при pH 7,0 и температуре 35<sup>0</sup>С. Гидрогели показали ожидаемое pH и температурно-зависимое поведение: при низких значениях pH и высокой температуре они имели максимальное набухание, в то время как при пониженной температуре и высоком pH степень набухания была минимальной. Увеличение ионной силы среды стало причиной продолжительного снижения набухания как в кислой так и в щелочной среде.

В другой работе [81] также были разработаны микросферы, сшитые формальдегидом, которые могут быть использованы для сорбции ионов меди из водных растворов. Было показано, что сорбция зависела от рН и концентрации ионов меди. Максимальная адсорбционная емкость хитозановых микросфер составила 144,928 мг/г при рН 6,0. С увеличением концентрации ионов меди увеличивалась поглощающая способность.

Также как и в случае ионно-сшитых гидрогелей, при ковалентном сшивании большое влияние на конечные свойства получаемых материалов оказывает плотность сшивки, в связи с чем важным является изучить условия получения ковалентно-сшитых гидрогелей.

Влияние времени сшивки и концентрации сшивающего агента на плотность полимерной сетки была изучена в работе [82] на примере химически сшитых микросфер на основе хитозана. Микросферы получали методом распылительной сушки с последующей обработкой сшивающим реагентом. С целью преодоления ограничений использования сшитых микросфер в фармацевтической области был использован глицериновый диальдегид. В качестве контроля использовали ГА. Сшивку проводили при температуре 5<sup>0</sup>С. Было выбрано 2 концентрации хитозана 0,5% и 2,5%. Авторы показали, что микросферы из более высококонцентрированного раствора хитозана обладали большей способностью к набуханию. По мере увеличения времени сшивания, равновесная степень набухания снижалась. Авторы пришли к выводу, что глицериновый диальдегид был более эффективен в сшивке хитозана, чем ГА при аналогичных условиях. Плотность поперечных связей в микросферах увеличивалась с увеличением продолжительности химической обработки, что приводило соответственно к уменьшению степени набухания.

Хитозановые мембраны, сшитые толуол-2,4-диизоцианатом, были получены в работе [83] и протестированы для дегидратации изопропанола методом диффузионного испарения. Реакция сшивки проиллюстрирована на рисунке 11. Диффузионное испарение – это эффективный и экономичный

способ разделения воды и органических растворителей. Было показано, что сшитые мембраны могли легко разрушить азеотроп смеси изопропанола и воды, что свидетельствует о том, что мембрана действует в качестве третьей фазы и выборочно пропускает молекулы воды. Сшивка не внесла значительных изменений в термическую и механическую стабильность мембран. Подобную систему также исследовали в работах [84] и [85]. В работе [85] показали, что увеличение содержания сшивающего реагента способствовало улучшению селективной способности из-за образования ковалентных связей.

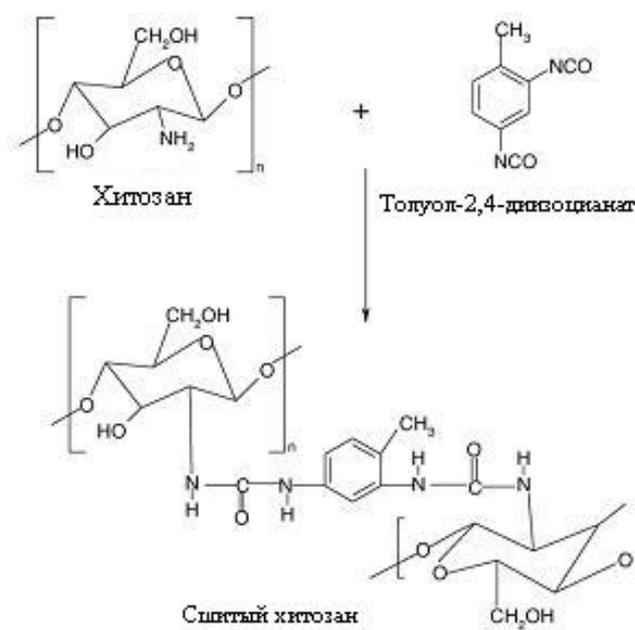


Рисунок 11 – Реакция взаимодействия хитозана с толуол-2,4-диизоцианатом [83]

В работе [86] были получены мембраны хитозана, сшитые  $\gamma$ -глицидоксипропилтриметоксисиланом. Полученные мембраны имели улучшенную термическую стабильность и низкую степень набухания в воде. После реакции сшивки поддерживалась гидрофильность хитозановых мембран. Данные мембраны могут быть применимы в качестве биоматериалов и разделительных мембран.

Эпихлоргидрин был использован для получения мембран для сорбции и десорбции ионов ртути. Количество сорбированных ионов зависело от pH

раствора и, естественно, начальной концентрации ионов. Максимальная сорбция наблюдалась при рН 6,0 [87].

Для сорбции ионов железа из водных растворов были изготовлены хитозановые частицы, сшитые рядом сшивающих реагентов: ГА, эпихлоргидрином и этиленгликольдиглицидиловым эфиром (ЭГДЭ). Сорбционная способность хитозановых частиц выше, чем сшитых, однако сшитые – нерастворимы в кислой и щелочной среде. Увеличение рН увеличивало сорбционную способность. Наибольшее количество сорбированных ионов железа было достигнуто при использовании эпихлоргидрина в качестве сшивающего реагента, а наименьшее при использовании ЭГДЭ. Было показано, что сшитые хитозановые частицы могут быть эффективным адсорбентами для ионов металлов.

Макропористые хитозановые мембраны с контролируемым размером пор и хорошими механическими свойствами были получены и сшиты с использованием ЭГДЭ с целью повышения их химической стабильности [88]. Они могут служить в качестве анионообменников с относительно высокой ионообменной емкостью, а также материалов для аффинной хроматографии.

Глиоксаль ( $C_2H_2O_2$ ) – диальдегид щавелевой кислоты. Влияние сшивки глиоксалем на структуру и свойства хитозановых волокон изучалось в работах [89, 90]. Увеличение концентрации глиоксаля снижало степень набухания, что указывало на протекание реакции сшивки [89]. Также было установлено, что наиболее оптимальны следующие условия: глиоксаль с концентрацией около 4% и рН 4,0, а условия протекания реакции: 40<sup>0</sup>С и 60-70 мин [90], так как при более высоких температурах, механические свойства материалов снижаются [91].

Таким образом, анализ литературы показал, что для ковалентной сшивки хитозана используются сшивающие реагенты различного строения и функциональности. Однако использование большинства из них ограничивается вследствие токсичности продуктов их взаимодействия с хитозаном. Так,

для получения материалов, использование которых не предполагает контакта с живым организмом, например, предназначенных для сорбции, наиболее подходящими сшивающими реагентами могут выступать толуол-2,4-диизоцианат, эпихлоргидрин, ЭГДЭ. Наиболее часто применяют формальдегид, использование которого экономически выгодно. При получении материалов медико-биологического назначения эти сшивающие реагенты не могут быть использованы и более целесообразно использование менее токсичных сшивающих реагентов, таких, например, как ГА, однако, как будет показано ниже, в случае ГА возможно образование продуктов различного состава. Таким образом, несмотря на такой широкий выбор сшивающих реагентов, поиск новых реагентов, перспективных для получения материалов медико-биологического назначения, остается актуальным.

### **1.3.2 Использование глутарового альдегида в качестве ковалентного сшивающего реагента**

ГА является наиболее популярным бифункциональным соединением при получении гидрогелей хитозана. Он легко реагирует с протеинами и полимерами, содержащими первичные аминогруппы, с образованием основания Шиффа за счет взаимодействия между карбонильной группой ГА и непротонированной аминогруппой полимера [92]. Реакция протекает при комнатной температуре с высокой скоростью в широком диапазоне pH. Несмотря на то, что реакция сшивки хитозана ГА изучена наиболее хорошо [8], структура и поведение ГА в водных растворах еще остается предметом исследования и обсуждения.

ГА широко применяется благодаря низкой стоимости и удобному способу модификации хитозана [79]. Кроме того, установлено, что скорость реакции ГА с первичными аминогруппами в значительной степени выше скорости реакции при использовании других алифатических диальдегидов [93]. Он является лучшим дезинфицирующим средством для холодной стерилизации медицинского оборудования, а также используется в качестве фиксатора

в гистохимии и электронной микроскопии, помимо этого он применяется при дубления кожи и в качестве ингредиента в косметической и химической специальности продукции [94, 95].

ГА в растворе может существовать в виде различных равновесных форм (рисунок 12). Методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектроскопии было показано, что увеличение pH с 3,0 до 4,2 практически не влияет на состав равновесной смеси, а при pH 5,6 происходит увеличение содержания линейных форм диальдегида [96]

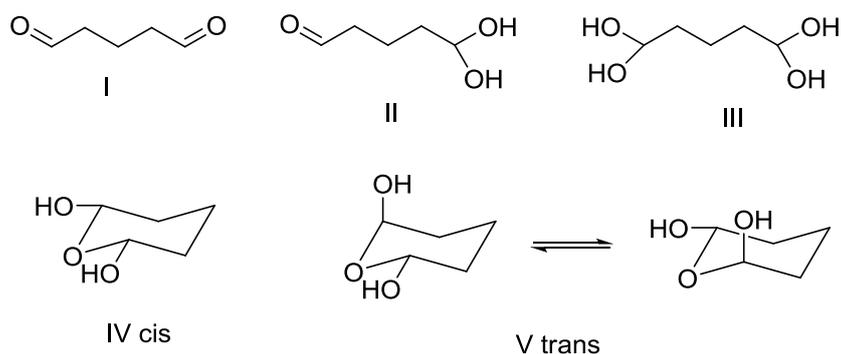


Рисунок 12 – Равновесные формы ГА в водных растворах [96].

При pH 8-13 (щелочная среда) ГА полимеризуется, причем с повышением концентрации гидроксильных ионов скорость полимеризации возрастает [8]. На рисунке 13 представлен механизм альдольной реакции и альдольной конденсации ГА. Первая стадия – образование альдоля (VI) (альдольная реакция), который затем дегидратируется до непредельного производного (VII) (альдольная конденсация). Последующая конденсация приводит к образованию полимерных продуктов (VIII) с молекулярными массами 12000–20000.

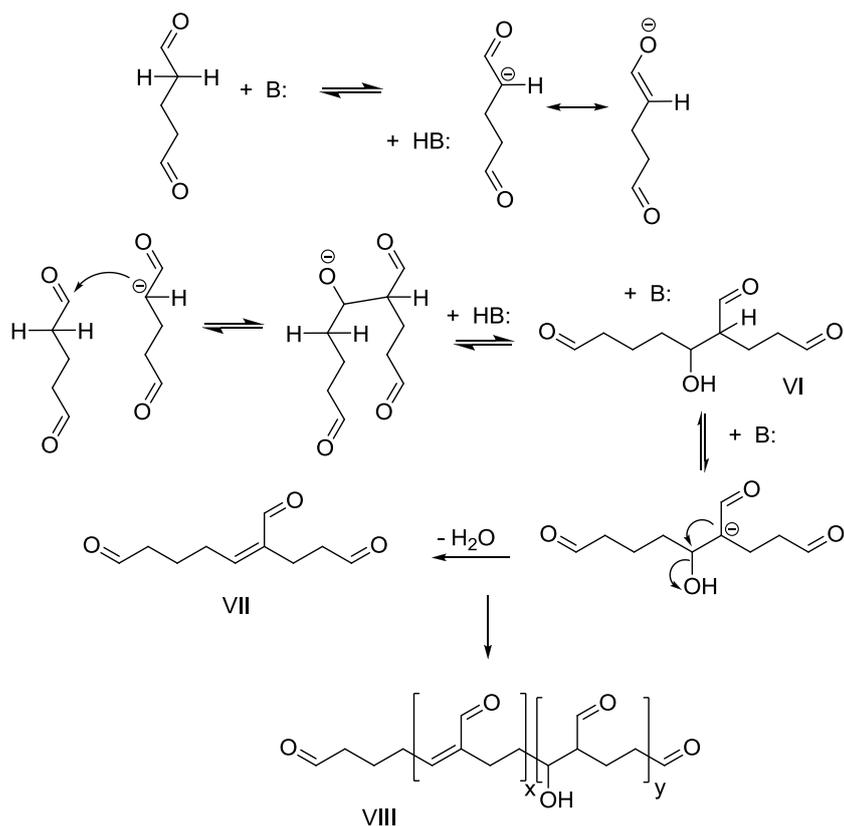


Рисунок 13 – Механизм альдольной реакции и альдольной конденсации ГА в щелочной среде [8]

Процесс гелеобразования в растворе хитозана в присутствии ГА протекает в несколько стадий: 1) модификация аминогрупп хитозана, 2) образование в результате межмолекулярных сшивок кластеров из макромолекул хитозана и 3) взаимодействие модифицированных и немодифицированных функциональных групп макромолекул хитозана в соседних кластерах, приводящее к образованию пространственно-структурированного геля [97]. Сшивка хитозана ГА является сложным процессом: хитозан инициирует олигомеризацию ГА с образованием неоднородных продуктов (рисунок 14), при этом в зависимости от условий проведения процесса (рН реакционной среды и концентрация ГА) меняются длина олигомерных цепей в модифицированном или сшитом хитозане и концентрация сопряженных связей  $N=CHCH=C<$  и  $O=CHCH=C<$  [8, 10] Необходимо учитывать этот факт при использовании реакции хитозана с ГА для создания материалов медико-биологического или медицинского назначения, так как с ростом числа сопряженных двойных свя-

зей увеличивается токсичность сшитого хитозана. Несмотря на указанные недостатки, на сегодняшний день ГА остается наиболее часто применяемым ковалентным сшивающим реагентом [8].

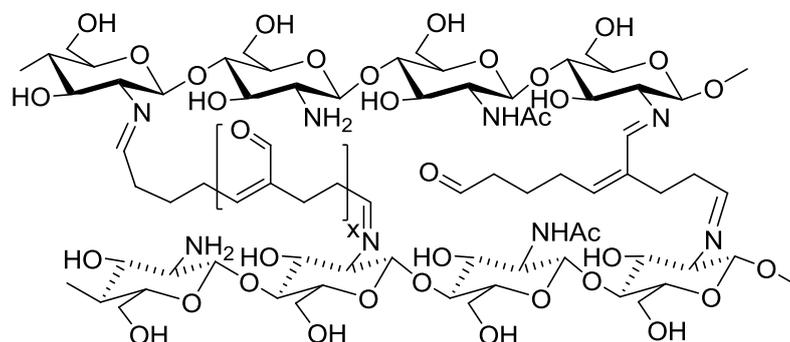


Рисунок 14 – Строение продуктов взаимодействия хитозана и ГА [8, 96,]

Известен целый ряд работ посвящен получению материалов на основе хитозана, сшитых глутаровым альдегидом [82, 98-102]. Так, например, в работе [98] представлены результаты по исследованию микросфер, полученных на основе гидрогелей хитозана, сшитого ГА. В этом исследовании были изучены кинетика гелеобразования и кинетика выделения противоопухолевого препарата 6-Меркаптопурина (6-МР) из полученных микросфер. Механизм гелеобразования хитозана в значительной степени зависел от условий сшивки. Время начала гелеобразования уменьшалось нелинейно с увеличением альдегида, и линейно уменьшалось с увеличением концентрации хитозана. Было показано, что чем больше плотность сшивки гидрогеля хитозана, тем ниже способность образцов к набуханию из-за медленной релаксации полимерной цепи, что приводило соответственно к снижению скорости выделения лекарственного вещества [98]. Аналогичные результаты были представлены в работе [101], где хитозановые гидрогели получали путем сшивки с ГА в виде пленок. Было показано, что увеличение содержания ГА приводило соответственно к увеличению степени сшивки, а что в свою очередь сопровождалось снижением влагопоглощающей способности [101].

Влияние соотношения исходных компонентов, температуры и рН среды на сорбционные характеристики хитозановых материалов, сшитых ГА, было изучено в работе [99]. В качестве модельного вещества был выбран п-нитрофенол. Температура гелеобразования влияла на внешний вид получаемых материалов, но не оказывала значительного воздействия на общую сорбционную емкость, в то время как значение рН раствора и соотношения сшивающего реагента к аминогруппам хитозана имело больше влияние на сорбционную способность. Таким образом, полученные материалы могут быть эффективны при сорбции соединений типа п-нитрофенола при оптимальном соотношении ГА:NH<sub>2</sub> 4:1.

Лекарственно-наполненные хитозановые микросферы были получены в работе [102] методом распылительной сухой техники, с использованием ГА в качестве сшивающего реагента и салициловой кислоты как модельного лекарства. Изучено влияние параметров процесса гелеобразования на морфологию хитозановых микросфер. Получены сферические микросферы диаметром 1-5 мкм с высокой эффективностью инкапсуляции 95,12% - 99,17%. Увеличение содержания лекарственного вещества приводило к изменению морфологии хитозановых микросфер от сферической до микросфер с нерегулярной формой. Микросферы проявили пролонгированный эффект выделения салициловой кислоты. Причем выделение лекарственного вещества было связано с количеством сшивающего агента, массовым соотношением салициловой кислоты и хитозана и рН среды.

В некоторых работах выявлена большая эффективность как сшивающего реагента глиоксаля (рисунок 15) по сравнению с ГА. В работе [100] было исследовано влияние ММ, степени дезацетилирования (СД) и плотности сшивки на степень набухания и пролонгированное выделение центхромана из микросфер хитозана, сшитых двумя типами реагентов: ГА и глиоксалем. Микросферы, сшитые глиоксалем, были более компактные, гидрофобные и меньшими по размеру из-за высокой степени сшивания. Они показали более

длительное высвобождение по сравнению с микросферами, сшитыми ГА [100]. Несшитые хитозановые микросферы набухали вплоть до 300%, после чего происходило их растворение. Микросферы, полученные с глиоксалем, обладали более низкой степенью набухания (200% в течение 30 ч) по сравнению с микросферами, полученными с помощью ГА (250% в течение 40 ч). В результате было показано, что для контролируемого высвобождения центрахромана оптимальные условия получения микросфер – это использование хитозана с ММ 1134 кг/моль и СД 62%. При этом количество глиоксаля, достаточного для модификации хитозановых микросфер, меньше, чем ГА [100]. Однако в большинстве работ именно использование ГА позволяет получить необходимый уровень свойств материала.

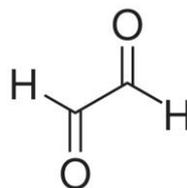


Рисунок 15 – Формула глиоксаля

Несмотря на широкое применение ГА в качестве сшивающего реагента, использование его в медицине все же ограничено, так как в ряде работ отмечается токсичность продуктов его взаимодействия с хитозаном. Даже если гидрогели промывают перед использованием, наличие в них свободных альдегидных групп, которые могут вызывать токсичное воздействие полностью исключить нельзя [50]. В связи с этим возникает необходимость поиска новых сшивающих реагентов для модификации хитозана. В последние годы наиболее перспективным и набирающим популярность соединением, обеспечивающим гелеобразование в растворе хитозана, является дженипин (Gr).

### **1.3.3 Модифицирование хитозана сшивающим реагентом природного происхождения дженипином**

Поиск новых сшивающих реагентов ковалентного типа является актуальным направлением при разработке новых материалов для использования в

биомедицинской области применения. В связи с этим во многих работах, посвященных получению гидрогелей, микрокапсул и других материалов медико-биологического назначения отмечаются перспективы использования Gr как природного соединения [50, 78, 103, 104]. Стоит отметить, что исследования хитозановых материалов, сшитых Gr, показали меньшую цитотоксичность по сравнению с материалами, полученными с использованием широко применяемого для сшивки хитозана ГА [11, 12].

Gr (рисунок 16а) получают путем ферментативного гидролиза дженипозиды (рисунок 16б)  $\beta$ -глюкозидазой. Для получения дженипозиды используют плоды двух растений *Gardenia jasminoides* Ellis и *Genipa Americana*, которые произрастают на Дальнем Востоке и в Южной Америке соответственно [105]. Эти растения применяли в восточной медицине, а также в качестве источника пищевого пигмента известного под названием *gardenia* синий [50].

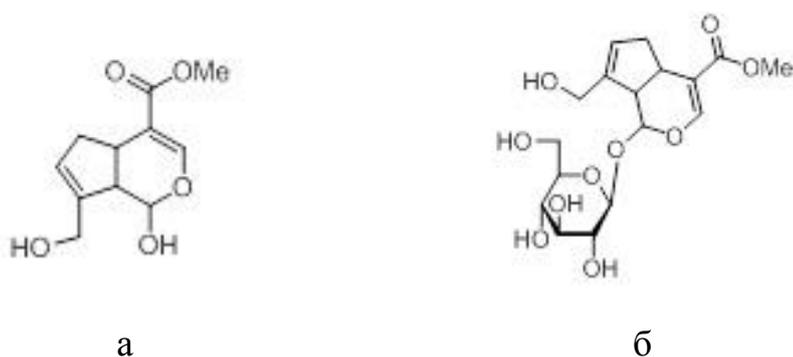


Рисунок 16 – Строение дженипина (а) и дженипозиды (б)

При взаимодействии дженипина с хитозаном протекает две реакции (рисунок 17). Наиболее быстрая первая реакция протекает в результате нуклеофильной атаки первичной аминогруппы на С3 углеродный атом дженипина, в результате чего формируется гетероциклическое соединение Gr, связанного с глюкозаминным остатком хитозана (рисунок 17.1). Вторая реакция, медленная, - это реакция нуклеофильного замещения эфирных групп, содержащихся в дженипине, с образованием амидной связи с хитозаном (рисунок 17.2) [106].

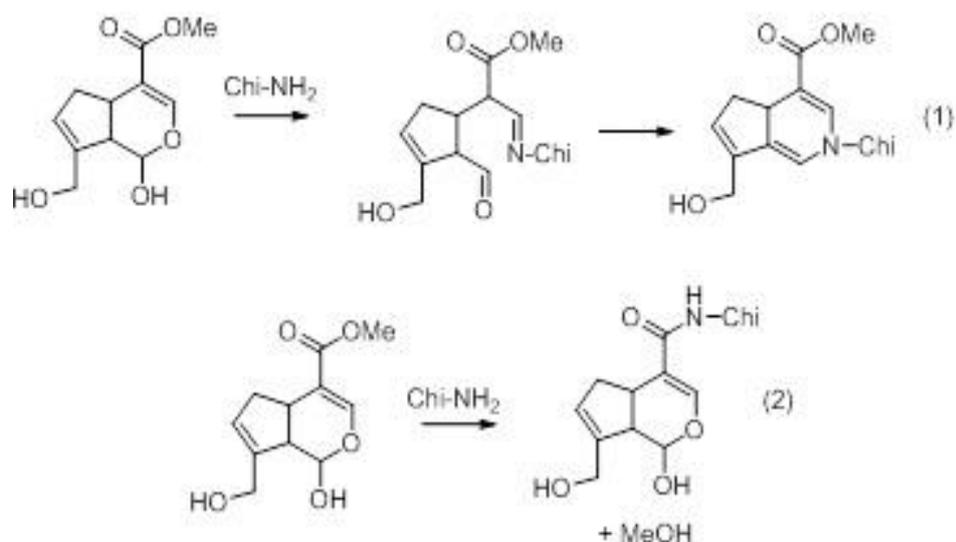


Рисунок 17 – Механизмы двух реакций Gr с хитозаном, приводящих к сшивке [20]; быстрая (1) и медленная (2) стадии реакции.

Добавление дженипина к раствору хитозана приводит к появлению синей окраски, интенсивность которой увеличивается с увеличением содержания Gr. Предполагается, что появление синей окраски связано с протеканием побочной реакции радикальной полимеризации Gr, индуцированной кислородом воздуха [107]. Этот процесс проиллюстрирован на рисунке 18. Как видно из рисунка, в процессе взаимодействия хитозана с Gr могут появляться не только димеры, но и более высокомолекулярные образования.

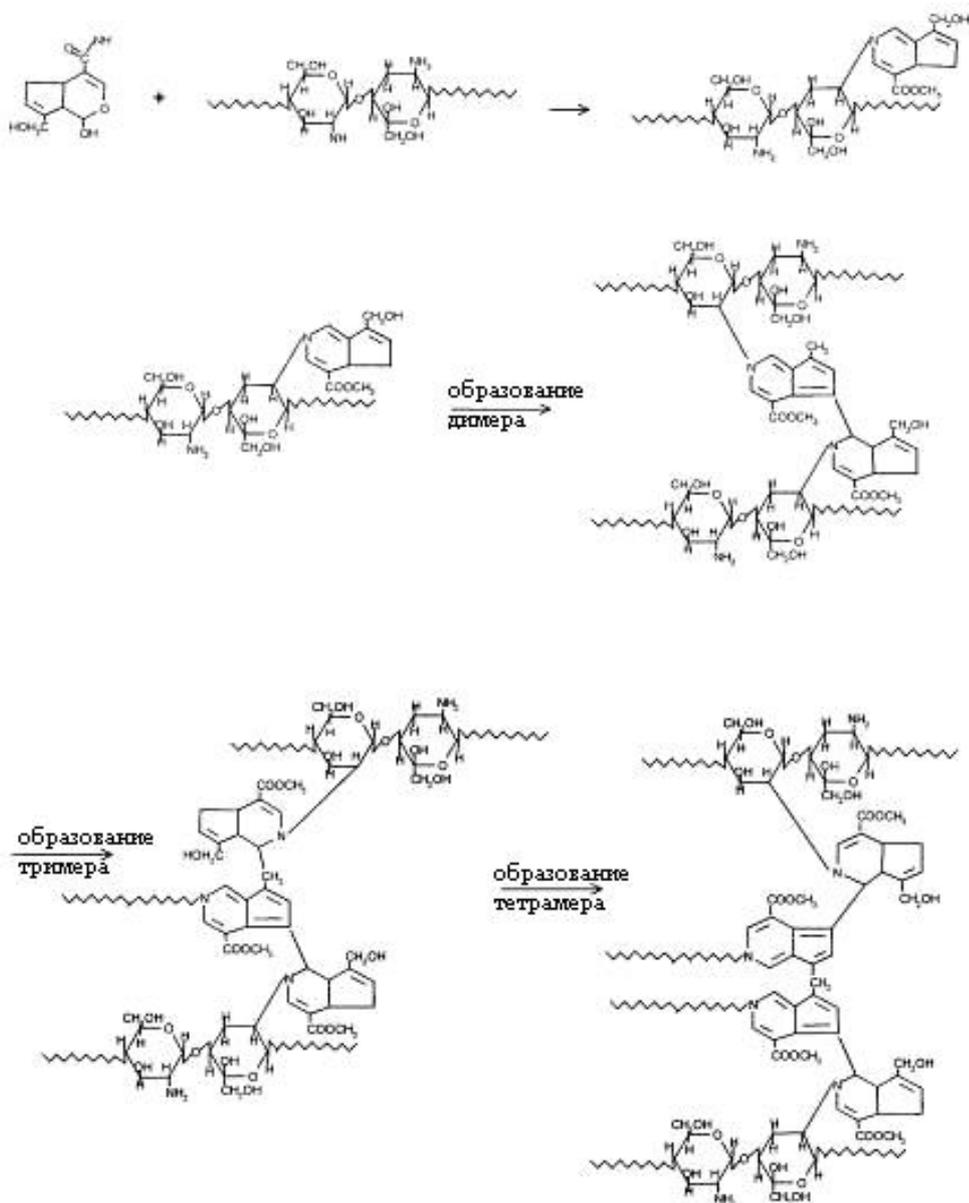


Рисунок 18 - Схема реакции хитозана с дженипином с образованием олигомеров дженипина[107]

При разработке технологии получения материалов на основе хитозана, сшитых дженипином, и выбора оптимальных параметров процесса сшивки, необходимо иметь более детальное представление о механизме протекания реакции хитозана с Gr, и о влиянии олигомеризации сшивающего реагента на гелеобразование в растворе хитозана в присутствии Gr.

Несмотря на меньшую эффективность как сшивающего реагента по сравнению с ГА и высокую стоимость, в значительном числе публикаций

описано использование Gr для получения хитозановых матриц для тканевой инженерии [8, 104, 108].

В работе [11] исследовались образцы исходного хитозана, а также хитозана, сшитого Gr и ГА. Была показана биологическая совместимость образца хитозана и удовлетворительная толерантность клеток по отношению к хитозановым пленкам, сшитым как Gr, так и ГА. Однако цитотоксичность хитозановой пленки, сшитой ГА, была выше, чем пленки, сшитой Gr, и увеличивалась при увеличении длительности экспозиции. Таким образом, благодаря низкому уровню токсичности и природному происхождению Gr все чаще применяется в качестве сшивающего реагента хитозана при разработке новых материалов для биотехнологии и медицины.

Результаты исследования цитотоксичности показали возможность формировать на его основе биосовместимые и стабильные материалы в 10000 раз менее токсичные, чем с использованием ГА [109]. Биосовместимость и способность к биодеградации делает полученные системы перспективными для использования в биомедицине.

Следует отметить, что в литературе иногда встречаются и противоположные данные. Авторы работы [110] установили оптимальное количество Gr не более 0,5 мМоль для применения в тканевой инженерии. Так как использование Gr с более высокой концентрации приводит к недопустимому уровню цитотоксичности.

Способы получения материалов на основе гелеобразующей системы раствор хитозана – дженипин в целом такие же, как при использовании ГА. В работе [103] были получены хитозановые наночастицы сшитые Gr методом формирования обратной микроэмульсии. Gr реагирует при мягких условиях с первичными аминогруппами хитозана и эту реакцию, как правило, идентифицировали по появлению голубой окраски, хотя ранее установлено, что синий цвет появляется в результате ряда сопряжений при образовании олигомерной цепи дженипина. Средний размер частиц составил 3-20 нм. Частицы

проявили слабую набухающую способность из-за жесткой структуры и гидрофобной природы сшивающего реагента.

Микрочастицы, полученные в работе [111], сшитые дженипином, использовались для удаления гепарина из крови. Было показано, что кинетика связывания гепарина была рН-зависимая и наиболее эффективно процесс протекает при более низких рН.

В работе [107] были получены хитозановые гели, сшитые дженипином. Реакция сшивки в большой степени зависела от рН. Степень сшивки напрямую была связана с рН: 39,9% при рН 5,0, 96,0% при рН 7,4, 45,4% при рН 9,0, и 1,4% при рН 13,6. Лучшая реакционная способность дженипина наблюдалась при нейтральном значении рН, приводящая к высокой степени сшивки и низкой степени набухания. Данные сопоставимы с результатами, приведенными в работе [104], где также показано влияние рН на механизм реакции хитозана с дженипином. Степень сшивки влияла на способность гидрогелей к набуханию и устойчивость к ферментативному гидролизу.

рН-зависимое набухание было показано в работе [112] при разработке гидрогелей хитозана, сшитых Gr. Было показано, что наибольшей степенью набухания обладали высушенные гидрогели при рН 1,0 и 13,0 (315% и 240% соответственно), в то время как при рН 7,0 степень набухания составила всего 62%. Это указывает на рН-зависимую релаксацию цепи сшитых хитозановых сеток. Повышенное набухание сшитых гидрогелей при рН ниже 3 и выше 11 может авторы связывают с гидролизом амидных связей кислотой или щелочью и регенерацией карбоксильной кислоты и аминокрупп в сетках.

Целью работы [71] было исследовать характеристики хитозановых пленок, сшитых дженипином, которые могут быть использованы в пищевой промышленности. Было обнаружено, что сшивка дженипином значительно увеличивала прочность пленок, но снижала деформацию при разрыве и набухание. Значительных различий при этом в антимикробной способности между сшитыми и несшитыми пленками не было. По сравнению с ГА, который

использовали в качестве модельного сшивающего реагента, пленки, сшитые Gr обладали низкой цитотоксичностью и более медленной скоростью деградации. Увеличение концентрации Gr приводило к увеличению степени сшивки, при этом набухание значительно снижалось. По сравнению с GA, пленки, сшитые Gr также обладали намного меньшим набуханием. Полученные результаты не противоречат приведенным в работе [113] данным, где также установлена меньшая токсичность и степень набухания по сравнению с GA. В связи с этим авторы отмечают, что полученные пленки могут быть перспективны в качестве систем контролируемой доставки лекарств.

Механизм сшивки, как и реакционная способность функциональных групп сшивающего реагента в реакции с аминогруппами хитозана при использовании Gr и GA различны, поэтому для получения определенного материала с использованием гелеобразующей системы раствор хитозана – дженипин необходимо исследовать взаимосвязь условий проведения реакции сшивки на механизм и скорость гелеобразования.

#### **1.3.4 Применение сшивающих реагентов ковалентного типа для создания материалов медицинского назначения**

Благодаря образованию стабильной пространственной сетки полимера, который обеспечивает свободную диффузию воды и упругие свойства гидрогеля во время химической сшивки хитозана, ковалентно-сшитые хитозановые гидрогели имеют два основных направления применения: системы контролируемой доставки лекарственных средств, позволяющих высвобождение биоактивных материалов, и в качестве биополимерных матриц для культивирования клеток или скаффолдов в тканевой инженерии и заместительной хирургии [50, 61, 97]. Помимо этого применение ковалентных сшивающих реагентов интересно также в областях, где требуется определенная форма материала, например, при разработке имплантатов или бинтов [50].

На основе ковалентно-сшитого хитозана пористые структуры с системой взаимопроникающих пор могут быть получены путем замораживания и

лиофилизации полимерного гидрогеля [61, 114- 116]. При этом характеристики исходной системы определяют структуру полученного матрикса (характер и распределение пор по размерам), а также степень адгезии и расплывания клеток, которые, в свою очередь, определяют их последующий рост и пролиферацию.

Авторами работы [7] путем лиофилизации гидрогелей хитозана, сшитого ГА или окисленным декстраном, были получены полимерные матрицы и исследована возможность культивирования на них мышечных клеток линии ATDC5 и бычьих хондроцитов (первичная культура-клетки хрящевой ткани). Матрицы имели систему взаимопроникающих пор, размер которых (120-350 мкм), при этом общая пористость и морфология пор варьировались в зависимости от соотношения хитозан - сшивающий реагент. В то время как скаффолды, сшитые окисленным декстраном, оказались не пригодными для культивирования клеток из-за низкой прочности, сшивка ГА способствовала поддержанию устойчивого роста клеток. При этом не было выявлено цитотоксичности образцов, полученных с использованием ГА. К аналогичному выводу пришли авторы работы [117], которые наблюдали в течение 14 дней успешную пролиферацию фибробластов в структуре хитозана, сшитого ГА под высоким давлением  $\text{CO}_2$  при градиентной разгерметизации системы, которая позволила увеличить поры и общую пористость получаемых гидрогелей.

Волокнистый биокатализатор, содержащий иммобилизованный трипсин были получены в работе [118]. Он состоял из тонкого гелевого слоя на основе хитозана, сшитого небольшим количеством ГА, на поверхности которого был иммобилизован фермент. Благодаря высокой сорбционной способности и некролитической активности ферментосодержащего материала, он может быть использован в качестве повязки для обработки ран.

Волокнистые материалы, сшитые ГА, разработанные в [119], проявляли рН-чувствительность, были нерастворимы в щелочной, кислой и

нейтральной средах. Благодаря этим свойствам, волокнистые нетканые материалы обычно используют в промышленности в качестве фильтрующего материала, катализаторов и датчиков [120]. рН-зависимым набуханием также обладали и пленочные материалы, сшитые дженипином [121]. Благодаря отсутствию токсичности и природному происхождению, его используют для фиксации и регенерации тканей, в системах доставки лекарственных средств в виде наночастиц, пленок, микросфер [103].

В ряде работ представлены исследования по получению мембран, сшитых ковалентными сшивающими реагентами, которые перспективны в биомедицине, в качестве раневых покрытий [107, 122]. В работе [107] были получены хитозановые мембраны путем погружения готовых пленок в раствор дженипина. Цвет мембран варьировался от прозрачного до голубоватого или коричневатого, в зависимости от рН, при котором проводилась сшивка. При рН 1.2 мембраны быстро растворялись еще до сшивки. Наименьшей степенью набухания обладали пленки, сшитые при нейтральных условиях. Это указывает на хорошую реакционную способность дженипина при нейтральных условиях, приводящую к высокой степени сшивки и низкой степени набухания. Пленки, сшитые при сильно основных условиях (рН 13.6), имели самую высокую степень набухания среди полученных из-за его низкой плотности сшивки [107]. Пленки, полученные в работе [121] имели голубой цвет, были эластичные, стабильные и имели хорошие механические свойства. Они не растворялись в кислой и в щелочной средах, но при этом обладали рН-зависимым набуханием. Пленки с низким содержанием дженипина (0,1%) растворялись при рН

Хитозановые гидрогелевые микросферы [111] были получены за счет сшивки хитозана в эмульсии с использованием Gr в качестве сшивающего реагента. Микросферы сильно набухали в воде при рН ниже 6,5 и меньше при рН выше 6,5. Кинетика связывания гепарина имела рН зависимый характер и была наиболее эффективна при низких значениях рН. Таким образом,

разработанная система может быть потенциально полезна для удаления гепарина из крови [111].

Наночастицы хитозана, сшитые Gr в обратной микроэмульсии, использовались в качестве наноносителей для фотосенсибилизатора в опухоли при фототермической терапии [123].

Контролируемое выделение кларитромицина, трамадола и гепарина было показано в работе [124].

В работе [125] хитозановые мембраны, сшитые Gr, показали хорошую биосовместимость для клеточной адгезии. Полученные материалы перспективны для использования для регенерации поврежденных глазных поверхностей.

В работе [126] выживаемость и пролиферация клеток фибробластов L929 была улучшена при сшивке Gr. Были получены нановолокнистые хитозановые материалы, сшитые дженипином. Волокна получали с низким содержанием ПЭО (до 3%). Сшивка Gr решила проблему растворения таких волокон в воде. Полученные нановолокна, сшитые 0,5% Gr были нетоксичны и рекомендованы авторами в качестве скаффолдов для тканевой инженерии.

\* \* \*

Таким образом, использование ковалентных или ионных сшивающих реагентов для модификации хитозана имеют свои недостатки и преимущества. Ионная сшивка является наиболее простым способом модификации хитозана, требующим мягких условий проведения сшивки, а благодаря нетоксичности, материалы на основе данной системы могут применяться в медицине и фармацевтике. Ионно-сшитые материалы по сравнению с ковалентными чаще используют для доставки лекарственных веществ. Однако главным недостатком их использования является низкая механическая прочность и рН зависимое растворение. Получение полимерных пленок путем объемной модификации хитозана ионными сшивающими реагентами в литературе

не описано, вследствие невозможности равномерного распределения ионного бифункционального соединения в растворе хитозана в результате местной коагуляции раствора. Однако данный способ получения пленок может позволить получить высоконабухающие и нерастворимые в воде пленки на основе хитозана. В связи с этим, перспективным являются исследования в данной области.

Преимущества использования ковалентных сшивающих реагентов – это возможность в широких пределах регулировать время гелеобразования и получать широкий спектр материалов заданной физической формы. Хитозановые ковалентно-сшитые гидрогели, в частности с использованием широко применяемого ГА, имеют более стабильную структуру, что обуславливает более высокие механические свойства. Однако использование их в медицине ограничено вследствие возможной токсичности. Альтернативой является сшивающий реагент природного происхождения дженипин. В связи с чем, перспективным является исследование новых систем на основе хитозана, сшитого дженипином.

Однако следует отметить, что причиной противоречивых данных о токсичности продуктов взаимодействия хитозана и ГА может быть использование в ряде работ образцов с высоким содержанием присоединенного сшивающего реагента. Поэтому представляет интерес исследование цитотоксичности биополимерных матриц на основе хитозана и ГА, а так же хитозана и Gr с минимальным содержанием сшивающего реагента, обеспечивающим формирование гидрогеля.

## 2 Методическая часть

### 2.1 Характеристика сырья и реактивов

Хитозан («Роерг», Германия), молекулярная масса 190 кДа и степень деацетилирования 87%.

Хитозан («Биопрогресс», Россия) с молекулярными массами 320 кДа и 95 кДа и степенью деацетилирования 88,5% и 87,3% соответственно.

Уксусная кислота марки «ХЧ»; ГОСТ 61 – 75 («Реахим», Ереванский завод химреактивов).

Дистиллированная вода; ГОСТ 6709 – 72.

Сшивающие реагенты: триполифосфат натрия и пирофосфат калия производства «Sigma», 25% водный раствор глутарового альдегида производства «Merck» (Германия), дженипин (Gp) «Sigma-Aldrich»,

Лидокаина гидрохлорид (ОАО «АС-фарм») в виде субстанции-порошка.

Мирамистин («Инфамед К») в виде субстанции-порошка,  $t_{пл} = 177\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Полимеры и реактивы были использованы без дополнительной обработки и очистки.

**Реагенты.** В работе с культурами клеток использовали культуральную среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM, ПанЭко, Россия), глютамин (ПанЭко, Россия), стрептомицин-пенициллин (ПанЭко, Россия), пируват натрия (Panreac, Испания), 2-меркаптоэтанол (Loba Feinchemie AG, Австрия), эмбриональную телячью сыворотку (PAA Laboratories GmbH, Австрия), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолий (МТТ, ПанЭко, Россия), кальцеин АМ (eBioscience, Великобритания), пропидиум йодид ( Immunotech / Beckman Coulter, Франция), 4', 6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид (DAPI) (Sigma, США) и диметилсульфоксид (ДМСО, Геликон, Россия).

## 2.2 Методы исследования

### ***Приготовление растворов хитозана***

Растворы хитозана в водном растворе уксусной кислоты необходимой концентрации готовили по точной навеске сухого полимера ( $\pm 0,0002$ г). Растворение полимера проводили на магнитной мешалке при 1100 об/мин.

### ***Приготовление растворов триполифосфата натрия и пирофосфата калия***

Растворы ТПФ и ПФ необходимой концентрации готовили в колбах на 50,0 мл по точным навескам ( $\pm 0,0002$ г).

### ***Приготовление растворов глутарового альдегида***

Растворы ГА нужной концентрации готовили путем разбавления исходного 25%-ного раствора.

### ***Приготовление растворов дженипина***

Растворы Gr необходимой концентрации готовили по точным навескам ( $\pm 0,0002$ г) в колбах подходящего объема.

### ***Определение электропроводности растворов***

Электропроводность растворов определяли на кондуктометре «Эксперт-002» фирмы Эконикс (Россия) с использованием стеклянного электрода. Растворы полимера и сшивающего реагента доводили до необходимых значений pH с помощью 1М растворов HCl и NaOH. Затем отбирали 20 мл раствора и вводили в измерительную ячейку, куда погружали электрод, и определяли электропроводность раствора.

### ***Кондуктометрическое титрование***

Электропроводность растворов хитозана в растворе уксусной кислоты в процессе титрования ТПФ или ПФ измеряли на кондуктометре «Эксперт-002» (Эконикс, Россия). После введения 1 мл сшивающего реагента значение электропроводности фиксировали. Далее строили графики зависимости электропроводности от объема сшивающего реагента, пошедшего на титрование  $\alpha = f(V)$ .

### ***Потенциометрическое титрование***

Потенциометрическое титрование осуществляли на рН-метре-милливольтметре 673 М с использованием стеклянного и хлорсеребряного электродов. Навеску хитозана массой 0,20 г растворяли в 20 мл 0,1М раствора HCl. Титрование осуществляли при непрерывном перемешивании при температуре 20°C 0,1М NaOH. Затем строили кривые потенциометрического титрования, из которых определяли объём раствора щёлочи, пошедшей на титрование.

### ***Определение значения рН в точке помутнения растворов полимеров***

Значение рН в точке помутнения растворов полимера проводили на спектрофотометре Thermo Spectronic Genesis 10UV (США) турбодиметрическим методом по увеличению оптической плотности растворов при  $\lambda = 400$  нм в процессе прибавления растворов сшивающих реагентов при перемешивании.

### ***Определение размера части оптическим методом***

Определение размера частиц, сформированных в растворах аминокислотсодержащих полимеров в присутствии ТПФ, проводилось турбидиметрическим методом. Для описания светорассеяния в системе использовалось эмпирическое уравнение Геллера:

$$A = k\lambda^{-n} \quad (1)$$

где  $A$  – оптическая плотность системы,  $\lambda$  – длина волны падающего света,  $k$  – константа, не зависящая от длины волны.

Показатель степени  $n$  в уравнении Геллера находили на основе турбидиметрических данных. Для этого экспериментально определяли оптическую плотность системы при различных длинах волн ( $\lambda = 400 - 625$  нм) при помощи спектрофотометра марки «Genesys» (США). Затем по графику зависимости  $\lg A = f(\lg \lambda)$  определяли показатель степени  $n$  в уравнении Геллера и по уравнению

$$a = 3,1 - 2,16 \cdot 10^{-2} (r-50) \quad (2)$$

рассчитывали радиус частиц системы.

### ***Метод динамического рассеяния света***

Определение размера частиц в системе проводилось методом динамического светорассеяния на приборе Photocor-FC. В приборе Photocor-FC рассеянный свет принимается фотоприемником (рисунок 19). Сигнал с выхода фотоприемника обрабатывается цифровым коррелятором. Из полученной автокорреляционной функции компьютер вычисляет распределение дисперсных частиц по размерам или их средний параметр.

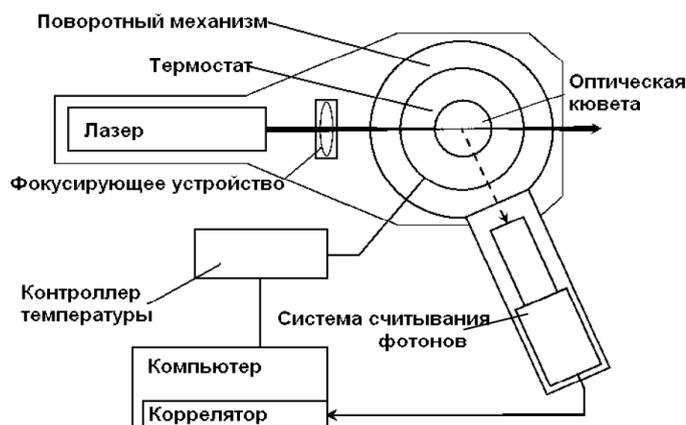


Рисунок 19 – Схема спектрометра динамического рассеяния света Photocor-FC

### ***Определение дзета-потенциала***

Электрокинетический потенциал на поверхности частиц определяли методом динамического квазиупругого светорассеяния суспензии полимеров на приборе Zetasizer Nano ZS.

### ***ИК-спектроскопия***

ИК спектры измерены при комнатной температуре на Фурье спектрометре «Shimadzu» IR Prestige 21 (Япония) с разрешением  $2 \text{ см}^{-1}$  и числом сканирований - 60. Образцы приготовлены по стандартной методике в матрице из плавленного NaCl (10 мг модифицированных образцов или 2 мг ТПФ/ ПФ/Lid в 250 мг NaCl). Модифицированные образцы хитозановых пленок многократно промывали водой от уксусной кислоты, контролируя содержание уксусной кислоты по УФ-спектрам.

### ***Определение времени гелеобразования.***

Гелеобразование в растворе хитозана в присутствии сшивающего реагента исследовали при различном мольном соотношении сшивающего реагента на аминогруппу хитозана. Точку образования геля в системе определяли как время, при котором раствор полимера объемом 1 см<sup>3</sup> прекращал течь при переворачивании пробирки диаметром 1 см под действием собственного веса. Полученные данные представляли в виде зависимости времени гелеобразования от соотношения сшивающий реагент/NH<sub>2</sub>.

### ***Изучение реологических свойств растворов хитозана в процессе сшивки***

Реологические свойства растворов хитозана при их взаимодействии с Gr или GA изучали на ротационном вискозиметре «Rheotest 2» (Германия). Исследования проводили с использованием в качестве воспринимающего элемента термостатируемую ячейку «цилиндр в цилиндре». При изучении кинетики гелеобразования в полимерных композициях, содержащих сшивающий реагент, следили за изменением напряжения сдвига систем при постоянной скорости сдвиговой деформации ( $\dot{\gamma}=3 \text{ с}^{-1}$ ). Значение динамической вязкости  $\eta$  рассчитывали как отношение напряжения сдвига  $\tau$  к скорости сдвига  $\dot{\gamma}$ :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}, [\text{Па} \cdot \text{с}] \quad (3)$$

### ***Кинетика изменения модуля сдвига гелей***

Кинетику изменения модуля сдвига гелей на основе хитозана, сшитого GA или Gr, проводили с использованием методики весового ступенчатого нагружения гелей с помощью аналитических весов АДВ-200. Набухший гель помещали между измерительными элементами, которые приводили в соприкосновение с гелем, и путем нагружения и уравнивали нагружением противоположной чашки весов. Далее на чашу весов устанавливали разновесы различной величины и определяли степень деформации геля в условных единицах. На основании полученных результатов строили зависимости  $h = f(F)$ , где  $h$  – деформация геля под действием нагрузки  $F$ . Затем выбирался ли-

нейный участок кривой, который соответствует обратимым деформациям. Затем рассчитывали эффективный модуль сдвига по формуле  $G = 8,1 \cdot 10^5 \cdot ctg \alpha$ .

### ***УФ-исследования***

Электронные спектры поглощения в процессе сшивки хитозана дженипином регистрировали в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм на спектрофотометре Thermo Spectronic Genesis 10UV (США): 2 мл раствора хитозана, содержащего Gr помещали в кювету и записывали спектры через определенные промежутки времени.

### ***Изотермы сорбции паров воды***

Сорбцию паров воды исследовали в эксикаторах с постоянной влажностью при комнатной температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Диапазон относительного изменения давления паров воды ( $p/p_s$ ) изменяли от 0,2 до 0,98. Измерения массы образцов проводили гравиметрически с точностью  $\pm 10^{-4}$  г.

### ***Получение гидрогелей***

Для получения гидрогелей использовали 2,5 или 4%-ные растворы хитозана в 2,5 и 4%-ных растворах уксусной кислоты соответственно. рН исходных растворов 3,8. Для получения растворов хитозана с рН 5,6 и 6,4 к исходному раствору в течение нескольких часов при перемешивании прибавляли микроколичества насыщенного раствора NaOH при постоянном потенциометрическом контроле. К 3,4 г раствора хитозана прибавляли 0,85 г водного раствора, содержащего расчетное количество ГА или Gr (конечная концентрация хитозана составляла 2 или 3,2%), и выдерживали в течение времени, необходимого для гелеобразования.

### ***Получение матриц***

Биополимерные матрицы получали замораживанием гидрогелей хитозана, сшитого Gr или ГА, при  $-5^\circ\text{C}$  и последующей сушкой из замороженно-

го состояния в вакууме с использованием лиофилизатора Alpha 1-4/2-4 («Christ», Германия).

### ***Формование плёнок***

Формование плёнок толщиной 50 мкм осуществляли методом полива на чашки Петри растворов хитозана. Пленки выдерживали до испарения растворителя при комнатной температуре, пока не устанавливалась постоянная масса пленки. Массу раствора полимера рассчитывали по формуле 4.

$$m = \frac{S \cdot h \cdot \rho \cdot 100}{C} \quad (4)$$

где S - площадь подложки, см<sup>2</sup>; h - толщина пленки, см; ρ - плотность полимера, г/см<sup>3</sup> (для хитозана 1,44 г/см<sup>3</sup>); C - концентрация раствора, %.

### ***Получение хитозановых пленок, поверхностно-модифицированных ионными сшивающими реагентами***

Модификацию пленок, полученных описанным выше способом, проводили путем их погружения в раствор триполифосфата натрия (0,5-1,0%) или пирофосфата калия (1,0%) с рН 6,0.

### ***Получение хитозановых пленок из формовочных композиций, содержащих низкомолекулярные полифосфаты***

Пленки готовили описанным выше способом, но предварительно в раствор хитозана (4%) дополнительно вводили 1 мл водного раствора ПФ (рН 6) при температуре 60<sup>0</sup>С при различных соотношениях [ПФ]/[NH<sub>2</sub>] (0,029; 0,072; 0,115; 0,144; 0,173), изменяя концентрацию раствора ПФ. Растворы, содержащие ТПФ, готовили путем введения водного раствора ТПФ (рН 6) в раствор хитозана (2%) в уксусной кислоте (2%) при соотношении [ТПФ]/[NH<sub>2</sub>]=0,036.

### ***Получение ковалентно-сшитых пленок***

Формование плёнок осуществляли методом полива на чашки Петри растворов хитозана, содержащих Gr или GA. Пленки выдерживали до испарения растворителя при комнатной температуре, пока не устанавливалась по-

стоянная масса пленки. Массу формовочного раствора рассчитывали по формуле 4.

#### ***Получение лекарственно-наполненных пленок***

Для получения лекарственно-наполненных пленок в растворы хитозана, дополнительно вводили лидокаин (1% от массы хитозана) или мирамистин (0,5% от массы хитозана).

#### ***Определение растворимости пленок***

Определение растворимости пленок проводили путем погружения образца (размером 2x2см) в пробирку с дистиллированной водой и выдерживания в течение суток. Пленки считали растворимыми при полном растворении в течение 1 часа; частично растворимыми в случае, если образцы в течение 24 часов полностью не растворялись.

#### ***Степень набухания и влагопоглощение***

Степень набухания пленок из хитозана, и общее влагопоглощение гидрогелевых матриц в воде изучали гравиметрическим методом. Образцы перед взвешиванием промокали фильтровальной бумагой. Степень набухания  $\alpha$ , % рассчитывали по формуле:

$$\alpha = \frac{m - m_0}{m_0} \cdot 100 \quad (5)$$

где  $m$  – навеска полимера после набухания, г;  $m_0$  – навеска полимера до набухания, г.

По полученным данным строили график зависимости степени набухания от времени  $\alpha = f(\tau)$ .

#### ***Определение кинетики выделения лекарственных веществ в физиологический раствор***

Исследование кинетики выделения мирамистина или лидокаина из хитозановых пленок в физиологический раствор NaCl (0,9%) (гидромодуль 150 мл/г) осуществляли путем фиксации изменения оптической плотности рас-

творов при длинах волн  $\lambda=200$  нм (для лидокаина) и 210 нм (для мирамистина) с использованием спектрофотометра Thermo Spectronic Genesis 10UV.

#### ***Определение морфологии пленок методом атомно-силовой микроскопии***

Морфологию поверхности пленок определяли методом атомно-силовой микроскопии. Образцы пленок из растворов хитозана, сшитые ПФ, изучали на микроскопе Ntegra Prima (NT-MDT). Испытания проводили в полуконтактном режиме с использованием зондового датчика CSG01 (размер - 3.4x1.6x0.3mm, радиус кончика иглы 10 нм, жесткость 0,03 Н/м).

#### ***Исследование внутренней структуры пленок***

Сканирование пленок проводилось на микроскопектронетре inVia Reflex, Renishaw (Великобритания). Длина волны возбуждения - 785 нм.

#### ***Определение физико-механических свойств гидрогелей***

Анализ физико-механических свойств образцов гидрогелей проводили на анализаторе текстуры Brookfield CT3 (США) при сжатии со скоростью 2 мм/с.

#### ***Конфокальная лазерная микроскопия***

Для визуализации пористой структуры, образцы матриц инкубировали в растворе иодистого пропидия (1 мкг/мл) в течение 30 мин. Супернатант декантировали и изучали образцы на инвертированном микроскопе Nikon TE-2000 (Япония)

*Все описанные ниже эксперименты по культивированию клеток проводили в Институте биоорганической химии РАН под руководством д.б.н. Марквичевой Е.А.*

#### ***Культивирование клеток***

Клетки фибробластов мыши (L929) культивировали в среде DMEM, с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 2 mM L-глутамина, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 1 mM пирувата натрия, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина. Культивирование проводили в 25 см<sup>2</sup> флаконах (SPL life sciences, Корея) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (HERAEUS B5060 EK/CO<sub>2</sub>) в газовой

среде, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, при температуре 37°C.

### ***Стерилизация образцов матриксов***

Образцы матриксов помещали в лунки стерильного 96-луночного планшета (Nunc, Дания) и стерилизовали этиловым спиртом в течение 1 ч. После этого спирт декантировали, а образцы трижды промывали водой milli-Q, добавляя ее по 300 мкл в каждую лунку. Затем к планшет вносили по 300 мкл milli-Q и инкубировали в термостате в течение 2 ч для полного удаления этилового спирта.

### ***Определение цитотоксичности матриксов***

Цитотоксичность гидрогелвых матриксов исследовали методом тестирования экстрактов. Для этого суспензию клеток (100 мкл, концентрация  $1 \times 10^5$  клеток /мл) помещали лунки 96-луночного планшета и в течение 24 ч культивировали. Затем в каждой лунке заменяли среду на 100 мкл экстрактов. Экстракты получали за счет добавления к стерилизованным образцам матриксов среды DMEM, содержащую 10% сыворотки (1 мл среды на 100 мг образца) и инкубированием при 37°C. в течение 24 ч. Далее экстракты отбирали и вводили к монослою клеток. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в среде без экстрактов. Затем через 24 ч культивирования клеток с помощью МТТ-теста оценивали жизнеспособность клеток в присутствии экстрактов. Для этого среду с экстрактами в каждой лунке заменяли на 100 мкл раствора МТТ (0,5 мг / мл) в DMEM и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Затем смесь среды с раствором МТТ декантировали, в лунки вводили по 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана и инкубировали 15-20 мин. Далее из каждой лунки отбирали аликвоты по 50 мкл и измеряли оптическую плотность (ОП) при длинах волн 540/690 нм на многоканальном планшет-ридере Multiscan (Flow Laboratories, США). Относительную жизнеспособность клеток определяли по следующей формуле: Доля жизнеспособных клеток = (ОП в тестовых лунках/ОП в контрольных лунках) x 100%.

### ***Изучение распределения и морфологии клеток***

Суспензию клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета к предварительно стерилизованным образцам гидрогелевых матриц (2x10<sup>4</sup> клеток/образец) и культивировали в стандартных условиях в течение 3 дней. Для визуализации клеток и структуры гидрогелей, образцы гидрогелей инкубировали в растворе красителей (Calcein AM и DAPI в DMEM) в течение 30 мин при 37°C. Далее супернатант декантировали, добавляли в каждую лунку по 150 мкл среды DMEM и изучали образцы матриц с клетками на инвертированном микроскопе Nikon TE-2000 (Japan).

### ***Математическая обработка результатов измерений***

Статистическая обработка результатов измерений проводилась с использованием стандартных программ.

### **3 Результаты и их обсуждение**

Как показано в литературном обзоре, хитозан является одним из наиболее перспективных полимеров для разработки материалов медико-биологического назначения, однако полученные из водных растворов органических кислот полимерные материалы: волокна, пленки микрогранулы, - растворимы в воде, что ограничивает область их применения. Перевод хитозана из солевой формы в форму основания обработкой щелочью приводит не только к потере материалом растворимости, но и к резкому снижению способности к набуханию в воде, появлению хрупкости. С целью перевода в нерастворимое состояние с сохранением влагоудерживающей способности и придания материалам на основе хитозана новых свойств используют модификацию сшивающими реагентами ковалентного или ионного типа. Выбор сшивающего реагента является важной задачей, определяющей технологические особенности процесса переработки хитозана в полимерный материал определенной физической формы и назначения.

Для использования хитозана в технологии получения материалов медико-биологического назначения с заданным уровнем функциональных свойств необходимо исследовать закономерности процессов модификации хитозана сшивающими реагентами, содержащими различные типы функциональных групп и гелеобразования в его растворах.

#### **3.1 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 ионизирующимися группами. Ионная сшивка является перспективным способом модификации хитозана, благодаря нетоксичности используемых реагентов и мягким условиям проведения процесса сшивки. Наиболее доступные ионные сшивающие реагенты - полифосфаты - химические соединения, яв-

ляющиеся олигомерами натриевых, калиевых или аммонийных солей ортофосфорной кислоты, в которых фосфорные остатки связаны между собой фосфоангидридными связями. Полифосфаты относятся к группе пищевых добавок – стабилизаторов, загустителей и эмульгаторов; в международной классификации полифосфаты известны под индексом E452 [127]. Кроме того полифосфаты используются как усилители роста дрожжевых клеток. В клетках живых организмов они регулируют уровень различных катионов, а также они участвуют в производстве тромбоцитов и играют важную роль в коагуляции крови [128]. Как показано в литературном обзоре, сшивка хитозана ТПФ позволяет получать на основе хитозана нано- и микрочастицы, избегая при этом нежелательных побочных эффектов.

Плотность сшивки является основным параметром, влияющим на важнейшие свойства сшитых полимерных материалов, таких как растворимость, механическая прочность, степень набухания и диффузионные характеристики. Поэтому для получения материалов с заданной степенью сшивки, а также с целью определения путей регулирования свойств полимерных пленок на основе хитозана необходимо было изучить условия взаимодействия функциональных групп полимера и сшивающих реагентов.

### **3.1.1 Изучение взаимодействие между полифосфатами и хитозаном**

С целью исследования влияния строения полифосфата и условий его взаимодействия с аминокетонами хитозана в процессе получения нерастворимых пленочных материалов в настоящей работе были использованы ионные сшивающие реагенты, содержащие различное число фосфатных групп: триполифосфат натрия и пирофосфат калия (рисунок 3).

Одним из условий образования ионных связей в результате взаимодействия с ионными сшивающими реагентами является наличие в макромолекуле хитозана положительно заряженных протонированных аминокетонных групп и отрицательно заряженных ионизированных фосфатных групп в молекулах ТПФ и ПФ. Чтобы произошла сшивка макромолекул аминокетонсодержащего полимера,

молекула сшивающего реагента должна содержать две ионизованные фосфатные группы, как минимум. Большая часть аминогрупп в растворе хитозана в уксусной кислоте протонирована и способна к электростатическим взаимодействиям с образованием ионной связи.

ТПФ и ПФ используются в виде натриевой и калиевой солей соответственно, водные растворы которых в зависимости от концентрации имеют рН 7,5 – 10,0. Однако хитозан при рН выше 6,2 теряет растворимость в воде. Соответственно, чтобы избежать осаждения хитозана, рН системы не должно превышать значения 6,2. При использовании соляной кислоты рН растворов ТПФ и ПФ можно снижать до кислых значений без потери их растворимости.

Плотность заряда ионных молекул, содержащих несколько функциональных групп, определяется значением рКа для каждой из них и рН раствора. Триполифосфат содержит 5 кислотных групп, способных к диссоциации, пирофосфат – 4 таких группы. рКа кислотных групп изменяются в широком диапазоне и составляют для ТПФ:  $pK_{a1}=1$ ;  $pK_{a2}=2$ ;  $pK_{a3}=2,79$ ;  $pK_{a4}=6,47$ ;  $pK_{a5}=9,24$ ; для ПФ:  $pK_{a1}=1,52$ ;  $pK_{a2}=2,36$ ;  $pK_{a3}=6,60$ ;  $pK_{a4}=9,25$  [129]. На основании значений рКа кислотных групп ПФ и ТПФ, а также данных потенциометрического титрования исследуемого образца хитозана были получены значения степени протонирования аминогрупп хитозана и степени ионизации фосфатных групп при различных значениях рН. Полученные данные не противоречат результатам, полученным в работе [16] для хитозана с молекулярной массой 460 кДа. С целью определения числа заряженных групп при различных значениях рН нами была установлена количественная зависимость плотности отрицательного заряда в молекулах ТПФ и ПФ от рН. С учетом того, что некоторые из кислотных групп фосфата диссоциируют в одинаковом диапазоне рН, результаты были получены с использованием известных значений рКа и заданных значений  $\alpha$  для каждой ионизирующейся группы полифосфата путем расчета соответствующих значений рН по уравнению Хассельбаха-Гендерсона:

$$pH = pK_a + \lg \frac{\alpha}{(1-\alpha)}, \quad (3)$$

где  $\alpha$  – степень диссоциации кислотной группы фосфата.

Полученные расчетные и экспериментальные зависимости числа отрицательно заряженных групп в молекулах ТПФ и ПФ и степени протонирования аминокрупп хитозана от рН (рисунок 20) дали возможность определить оптимальные условия для реализации ионной сшивки: область значений рН, внутри которой аминокруппы хитозана протонированы и имеют положительный заряд, а сшивающие реагенты содержат две и более отрицательно заряженных групп.

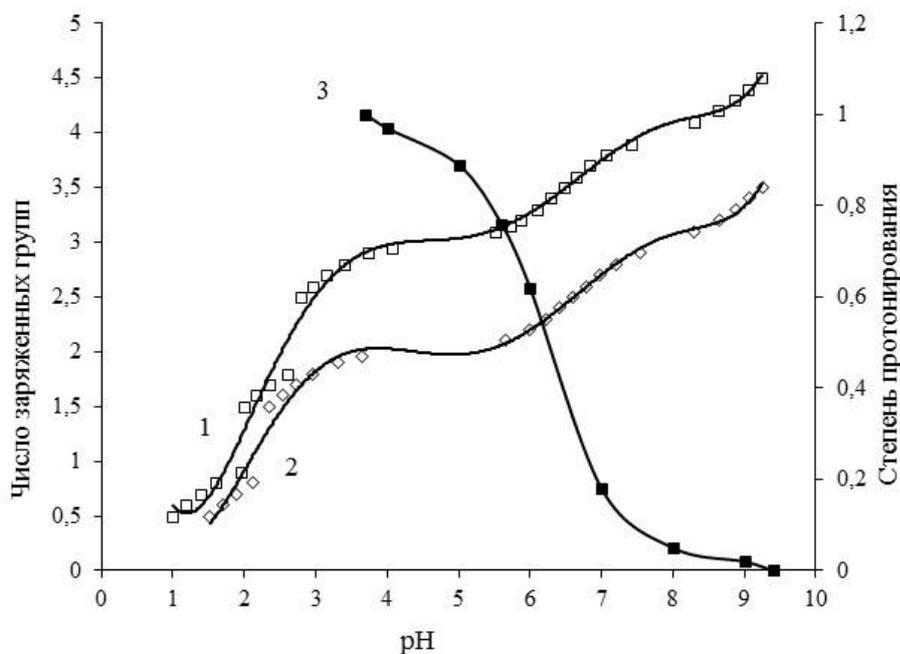


Рисунок 20 – Влияние рН на ионизацию триполифосфата натрия (1), пирофосфата калия (2) и хитозана (3)

### 3.1.1.1 Кондуктометрические и нефелометрические исследования взаимодействия хитозана с полифосфатами

С целью изучения взаимодействий в растворе хитозана в процессе его сшивания ионным сшивающим реагентом были проведены кондуктометрические и нефелометрические исследования. Для исследования были выбраны значения рН, при которых хитозан имеет разную степень протонирования, а

молекула полифосфата – не менее двух ионизованных групп, способных к образованию ионных связей с протонированными аминогруппами хитозана (Таблица 1). Эти условия должны обеспечить возможность сшивания хитозана полифосфатом.

Таблица 1 – Степень ионизации ТПФ, ПФ и хитозана при выбранных значениях рН.

рН	Число заряженных групп		Степень протонирования аминогрупп $\alpha$ в хитозане
	в молекуле ТПФ	в молекуле ПФ	
4,0	3,0	2,0	0,9
6,0	3,4	2,2	0,62

Увеличение числа ионогенных групп приводит к росту электропроводности, а образование ионных связей с триполифосфатом уменьшает число протонированных аминогрупп в растворе хитозана, что приводит к падению электропроводности. В результате межмолекулярной сшивки полимеров происходят последовательные процессы роста молекулярной массы хитозана, появление кластеров в растворе, их увеличение и образование новой фазы. Потеря растворимости в воде при взаимодействии полиэлектролитов с противоположно заряженными молекулами может быть также связана с уменьшением заряда макромолекул в совокупности с увеличением молекулярной массы полимера. Таким образом, кондуктометрические исследования, в сочетании с результатами нефелометрии, являются информативным методом исследования взаимодействий в растворе полиэлектролита в процессе его сшивания ионными сшивающими реагентами.

Кондуктометрическое исследование, результаты которого приведены на рисунке 21, показали, что, несмотря на появление в растворе ионизованных фосфатных групп ПФ и ТПФ, электропроводность раствора хитозана в процессе титрования уменьшалась, что указывает на образование ионных связей между протонированными аминогруппами полимера и отрицательно заря-

женными группами фосфата. При рН 6,0 степень ионизации фосфатов выше, чем при рН 4,0, поэтому падение электропроводности происходит значительно быстрее.

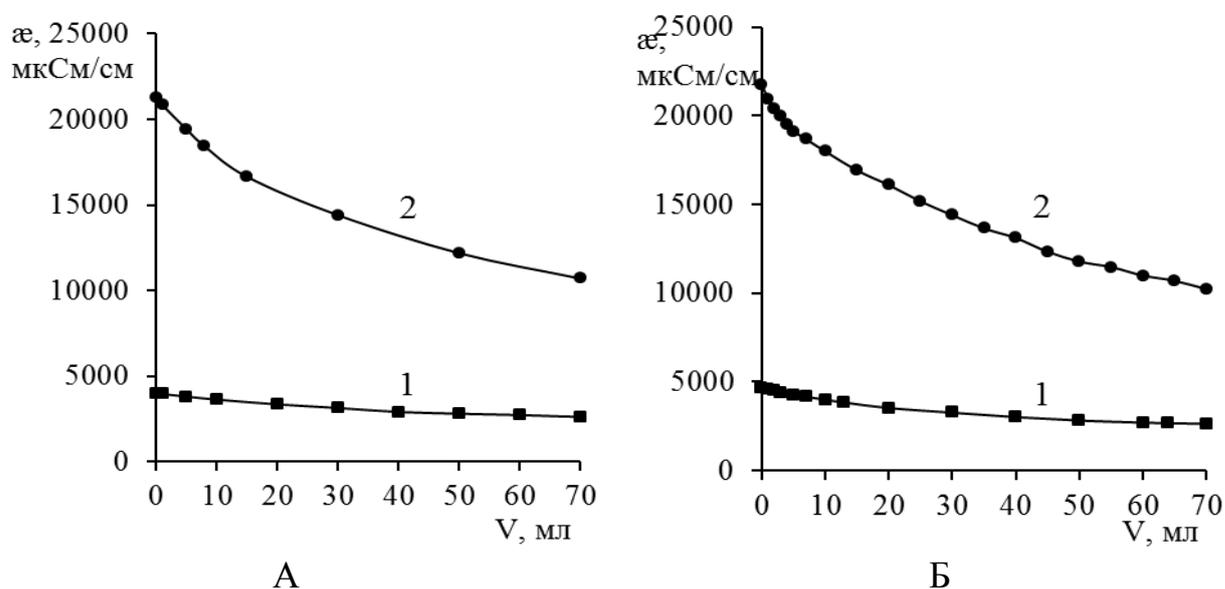


Рисунок 21 – Изменение электропроводности 0,3% растворов хитозана в 2% уксусной кислоте в процессе титрования 0,1% растворами ПФ (А) или ТПФ (Б) при разных рН:

1 – рН=4; 2 – рН=6

Результаты нефелометрических измерений показали, что при рН 6,0 помутнение раствора вследствие ионной межмолекулярной сшивки хитозана ТПФ происходит при соотношении  $[\text{ТПФ}]/[\text{NH}_2]$  в 6 раз меньше, чем в случае использования ПФ (рисунок 22), что обусловлено большим содержанием ионизованных функциональных групп в молекуле ТПФ (таблица 1). Несмотря на то, что при рН 4,0 молекула ПФ содержит 2 ионизованные группы, помутнение раствора не происходило даже при прибавлении 100 мл 0,1% раствора ПФ (Рисунок 23, кривая 7), по-видимому, в этих условиях достигаемой степени модифицирования хитозана не достаточно для потери им растворимости в воде. Увеличение числа ионизованных групп в полифосфате до 3,0 (ТПФ) при этом же значении рН оказывается достаточным для сшивки хитозана (таблица 1).

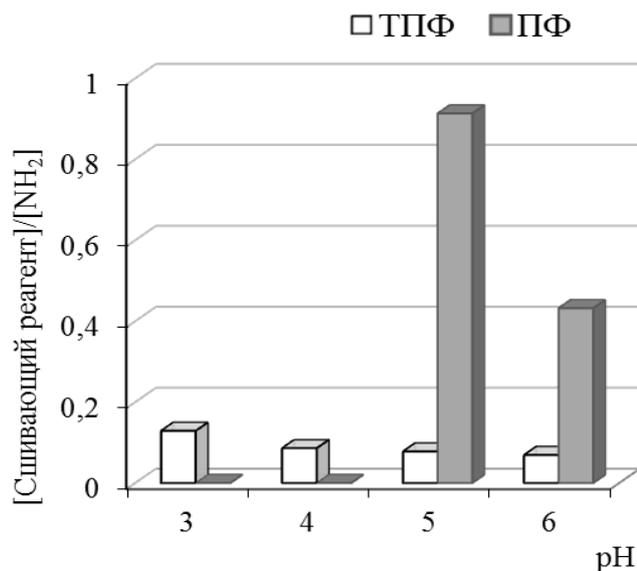


Рисунок 22 – Изменение количества сшивающего реагента (ТПФ или ПФ) в точке помутнения 0,3% раствора хитозана в 2% уксусной кислоте в процессе титрования 0,1% раствором ТПФ или ПФ при различных значениях pH

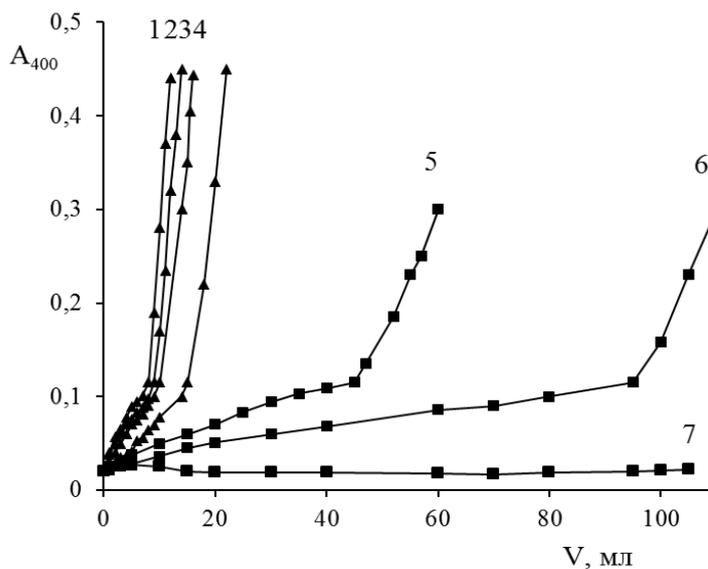


Рисунок 23 – Изменение оптической плотности 0,3% раствора хитозана в 2% уксусной кислоте в процессе титрования 0,1% растворами ТПФ (▲) или ПФ

(■) при разных pH:

1, 5 – pH = 6

2, 6 – pH = 5

3, 7 – pH = 4

4 – pH = 3

Полученные результаты показывают, что ТПФ и ПФ за счет электростатических взаимодействий сшивают хитозан в широком диапазоне рН.

### 3.1.1.2 Изучение процесса формирования наночастиц в растворе хитозана

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 в 0,3% растворе хитозана в 2%-ной уксусной кислоте при добавлении 0,1% водного раствора ТПФ при рН 6,0 в количестве, соответствующем точке помутнения раствора (таблица 2).

Таблица 2 – Размер частиц, формирующихся в растворе хитозана при рН 6,0

Хитозан рН=6				
Время, мин	1	3	6	10
Размер, нм	193,2 ±30	183,7 ±14	222,5 ±18	160,2 ±12

Как видно из полученных данных, процесс формирования наночастиц происходит довольно быстро, но в дальнейшем, наблюдается укрупнение наночастиц, которое может происходить вследствие прикрепления к их поверхности новых макромолекул или более мелких наночастиц. Следует отметить, что размеры наночастиц полимера, сшитого ТПФ, при использовании метода динамического светорассеяния оказались выше полученных из зависимостей  $A=f(\lambda)$ .

Определение заряда дзета-потенциала хитозана показало, что полимер в растворе с рН 6 заряжается положительно, при прибавлении ТПФ, содержащего отрицательно заряженные группы, заряд уменьшается.

Дзета-потенциал был измерен методом динамического квазиупругого светорассеяния (таблица 3).

Таблица 3 – Значение дзета-потенциала при добавлении ТПФ

Раствор С = 0,3 % (V = 1 мл)	Объем ТПФ, мл С = 0,1 %	рН растворов	ξ-потенциал, мВ
Хитозан	0	6	14,6
	0,2		13,6
	0,4		13,0
	0,5		12,2
	0,6		12,1

Особенности взаимодействий между хитозаном и полифосфатами исследовали с помощью ИК-спектроскопии.

### 3.1.1.3 ИК-спектроскопия хитозана, модифицированного полифосфатами

На рисунке 24 приведены Фурье ИК спектры хитозана (1); триполифосфата натриевой соли (2); пленки из хитозана, выдержанной в растворе ТПФ 15 минут (3); пленки из хитозана, выдержанной в растворе ТПФ 30 минут (4). ИК спектр чистого хитозана хорошо согласуется с приведенными в литературе данными [130]. В частности, в высокочастотной области наблюдается интенсивная уширенная полоса поглощения с центром тяжести при  $3442\text{ см}^{-1}$ , являющаяся суперпозицией полос валентных колебаний  $\nu(\text{OH})$  и  $\nu(\text{NH})$  хитозана.

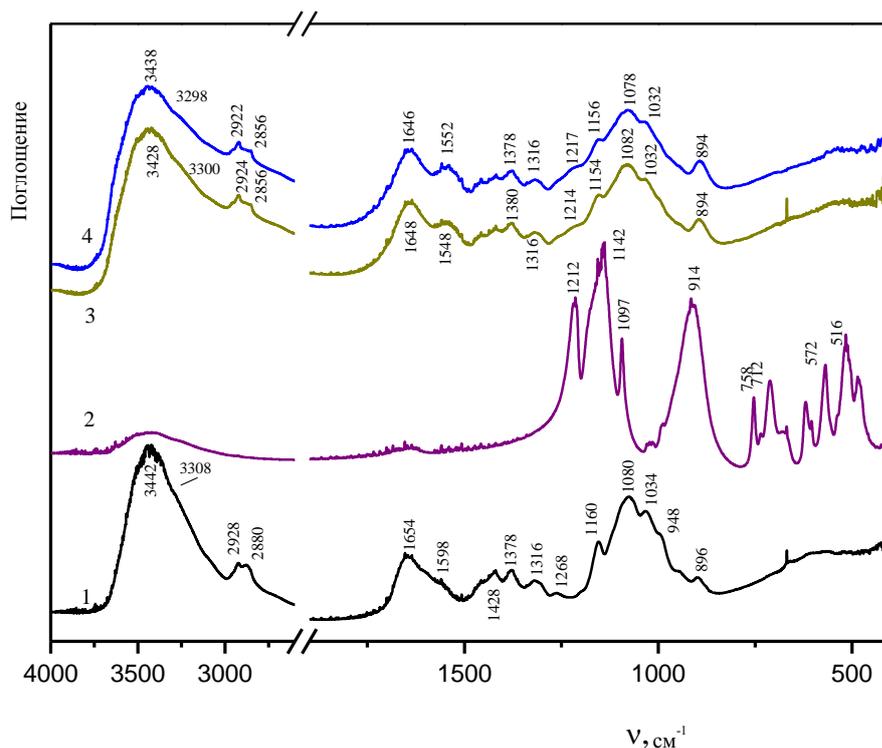


Рисунок 24 – Фурье ИК спектры хитозана (1); триполифосфата натриевой соли (2); пленки из хитозана, выдержанной в растворе ТПФ 15 минут (3); пленки из хитозана, выдержанной в растворе ТПФ 30 минут (4)

В ИК спектре ТПФ присутствуют характеристические полосы валентных колебаний различных группировок с максимумами  $1216 \text{ см}^{-1}$  –  $\nu(\text{P}=\text{O})$ ,  $1142 \text{ см}^{-1}$  –  $\nu(\text{PO}_2)$ ,  $1097 \text{ см}^{-1}$  –  $\nu(\text{PO}_3)$ ,  $914 \text{ см}^{-1}$  –  $\nu_{\text{as}}(\text{POP})$ , и деформационных колебаний  $\delta(\text{PO}_2)$  при  $758, 712 \text{ см}^{-1}$ , и  $\delta(\text{POP})$  мостиковых групп при  $572, 516 \text{ см}^{-1}$  [131]. Структурная перестройка, происходящая при модифицировании хитозана ТПФ, сопровождается изменениями в спектрах 3 и 4. Наблюдается низкочастотное смещение и заметное уширение полос поглощения, соответствующих колебаниям  $\nu(\text{OH})$  и  $\nu(\text{NH})$ , что указывает на образование дополнительных водородных связей в матрице сшитого хитозана. Происходит увеличение интенсивности и сдвиг в область низких частот полосы деформационных колебаний  $\delta(\text{NH}_2)$ , что указывает на вовлечение этих групп в связывание с  $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  -анионами. Кроме того, появляются полосы при  $1217\text{-}1214 \text{ см}^{-1}$ , соответствующие колебаниям  $\nu(\text{P}=\text{O})$ . В работах [19, 21, 51] наблюдали похожие результаты при исследовании формирования хитозановых наночастиц

и пленок в результате взаимодействия с фосфатами, в том числе появление в спектрах образцов сшитого хитозана полос для P=O в той же области спектра.

Модифицирование хитозана ПФ, по-видимому, ведет к образованию более упорядоченных структур. Для спектров образцов 3 и 4 (рисунок 25) характерно повышение интенсивности и лучшее разрешение колебательных полос по сравнению с исходным хитозаном. Изменения в спектрах хитозановых пленок, модифицированных ПФ (рисунок 25) еще более очевидны, чем для пленок, сшитых ТПФ (рисунок 24).

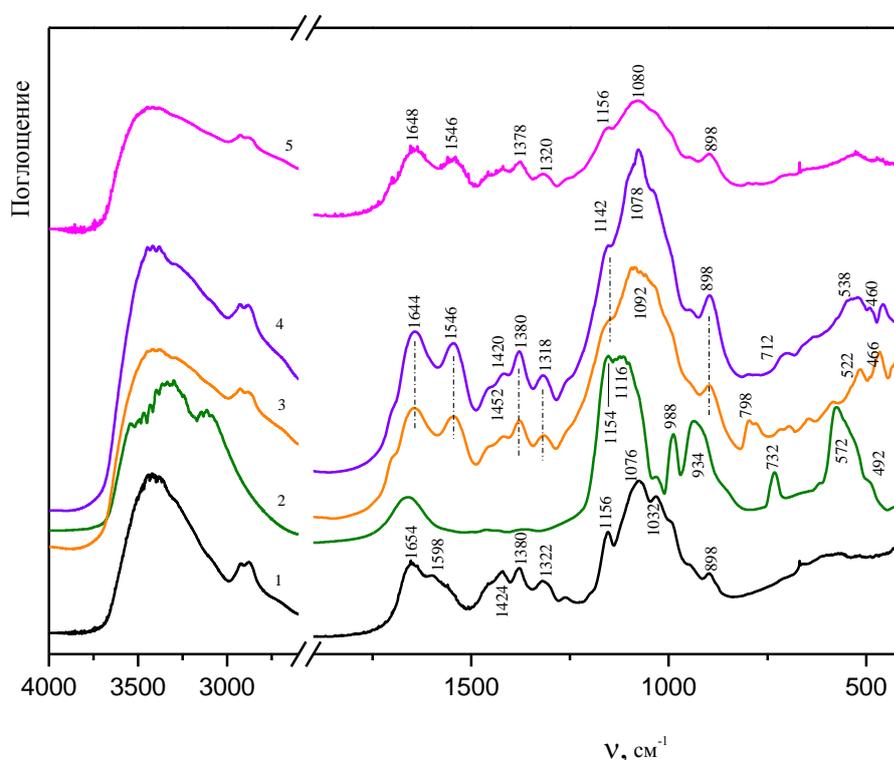


Рисунок 25 – Фурье ИК спектры хитозана (1); пирофосфата калия (2); пленки из хитозана, выдержанной в растворе ПФ 15 минут (3); пленки из хитозана, выдержанной в растворе ПФ 30 минут (4); пленки из хитозана, выдержанной в растворе ПФ 15 минут, после выдерживания в воде в течение 2 часов (5)

Полосы деформационных колебаний  $\delta(\text{NH}_2)$  заметно сдвинуты к низким частотам, что указывает на взаимодействие амидных групп с пирофосфат-ионами. Сильная полоса в диапазоне  $1200 - 750 \text{ см}^{-1}$  является суммарной и обусловлена колебаниями  $\nu(\text{CO})$ ,  $\nu(\text{C-O-C})$  хитозана и  $\nu(\text{PO}_2)$ ,  $\nu(\text{PO}_3)$ ,  $\nu_s(\text{POP})$

пирофосфат-иона. В низкочастотном диапазоне спектров 3 и 4 проявляются новые полосы, которые логично отнести к деформационным колебаниям различных типов  $P_2O_7^{4-}$ -иона.

Наиболее эффективно ионная сшивка протекает при рН 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 хитозановых пленок. Процесс модификации хитозана осуществляли двумя способами: путем поверхностной обработки хитозановых пленок или путем введения сшивающего реагента на стадии получения формовочного раствора полимера.

### **3.1.2 Получение хитозановых пленок, поверхностно-модифицированных полифосфатами**

В зависимости от назначения и области применения пленочных материалов к ним предъявляются различные требования. В связи с этим очень важно иметь возможность регулировать и направленно воздействовать на такие свойства пленок, как растворимость, проницаемость и влагопоглощение. Использование в качестве сшивающего реагента триполифосфата натрия и пирофосфата калия и рационально подобранные условия позволяют реализовать данные задачи.

Были получены хитозановые, сшитые ТПФ и ПФ методом обработки пленок, полученных из уксуснокислотных водных растворов хитозана, раствором сшивающих реагентов.

#### **3.1.2.1 Исследование влагопоглощающих свойств пленок**

Выбор концентрации сшивающих реагентов для дальнейшей модификации свежесформованных пленок на основе хитозана осуществляли с учетом технологии, которая предусматривает небольшое время контакта пленки и раствора сшивающего реагента, а также необходимости предотвращения ее растворения в процессе поверхностной обработки (учитывая, что хитозан в свежесформованной пленке находится в солевой форме, а обработку сшива-

ющими реагентами осуществляют из водного раствора). При помещении пленок на основе хитозана в растворы ТПФ (0,5% и 1,0%) или ПФ (1,0%) с последующей промывкой водой были получены нерастворимые материалы. При увеличении времени выдерживания пленки в растворе ТПФ или ПФ от 15 до 30 минут равновесная степень набухания хитозановых пленок, снижалась от 196 до 80% для ТПФ и от 165 до 148% для ПФ (рисунок 26). Низкие значения степени набухания модифицированных пленок могут быть связаны с высокой скоростью диффузии сшивающего реагента внутрь пленок и высокой степенью превращения аминогрупп хитозана в объеме пленки. В случае ПФ на ИК-спектрах удалось зафиксировать, что изменения в спектре образца, выдержанного в растворе ПФ в течение 30 минут (спектр 4, рисунок 25), выражены сильнее, чем в спектре образца 3 (время обработки 15 минут).

В процессе набухания в воде может происходить частичное разрушение образовавшихся при сшивке связей. Об этом свидетельствует ИК-спектр (5) пленки из хитозана, модифицированной ПФ после выдерживания в воде в течение 2 часов (рисунок 25). По сравнению со спектром 3 исходной модифицированной пленки, спектр 5 имеет диффузный характер с ослаблением и уширением основных колебательных полос. При этом в спектре по-прежнему присутствует полоса поглощения, отвечающая характеристическому колебанию  $\delta(\text{NH}_2)$  при  $1546 \text{ см}^{-1}$ , что подтверждает взаимодействие противоположно заряженных функциональных групп полиэлектролита и пирофосфата.

Наибольшей степенью набухания в воде обладали пленки, полученные с использованием ТПФ с концентрацией 0,5% (рисунок 26, кривая 5). Хитозановые пленки, обработанные 0,5% раствором ПФ, растворяются в воде, поэтому для получения лекарственно-наполненных пленок был использован ТПФ в виде 0,5% раствора, а ПФ в виде раствора с концентрацией 1%.

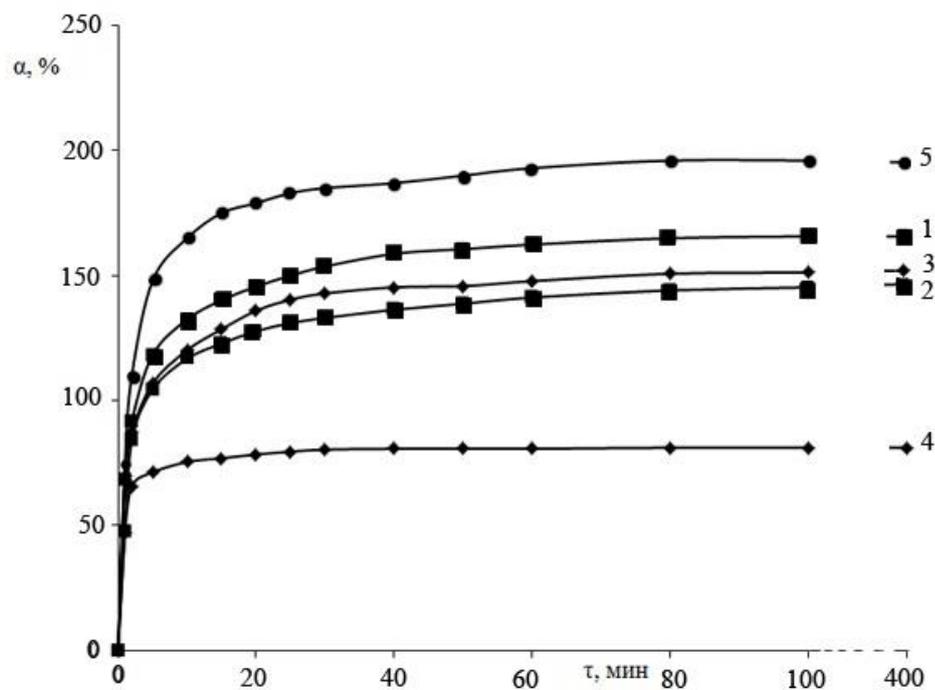


Рисунок 26– Кинетика набухания хитозановых пленок при различных сшивающих реагентах и времени обработки (1 – ПФ 1,0% , 15 минут; 2 – ПФ 1,0%, 30 минут; 3 – ТПФ 1,0%, 15 минут; 4 – ТПФ 1,0%, 30 минут; 5 – ТПФ 0,5%, 30 минут).

### 3.1.3 Получение биологически-активных хитозановых пленок, поверхностно-модифицированных полифосфатами, и регулирование их влагопоглощения и фармакокинетических свойств

Введение в хитозановые пленки анестетика местного действия лидокаина позволит придать материалу обезболивающее действие. Лидокаин плохо растворяется в воде, в связи с этим применяют его солянокислую соль – гидрохлорид лидокаина. Механизм анестезирующего действия заключается в подавлении возбудимости чувствительных нервных окончаний и торможении распространения сигнала по нервным волокнам.

Биологически активные хитозановые пленки, содержащие лидокаин в количестве 1% от массы полимера, были получены из 4% раствора хитозана в 4% уксусной кислоте. Полученные пленки обрабатывали водными растворами ТПФ и ПФ. С целью регулирования скорости высвобождения биологически активных веществ из полимерных пленок продолжительность

обработки изменяли от 15 до 30 минут. Кинетику выделения лекарственных веществ исследовали в модельных условиях, используя 0,9% раствор NaCl. Замена воды на 0,9% раствор NaCl незначительно повлияла на кинетику набухания пленок, модифицированных ПФ или ТПФ (рисунок 27), по-видимому, ионной силы используемого раствора недостаточно для разрушения взаимодействий между протонированными группами хитозана и ионизованными фосфатными группами.

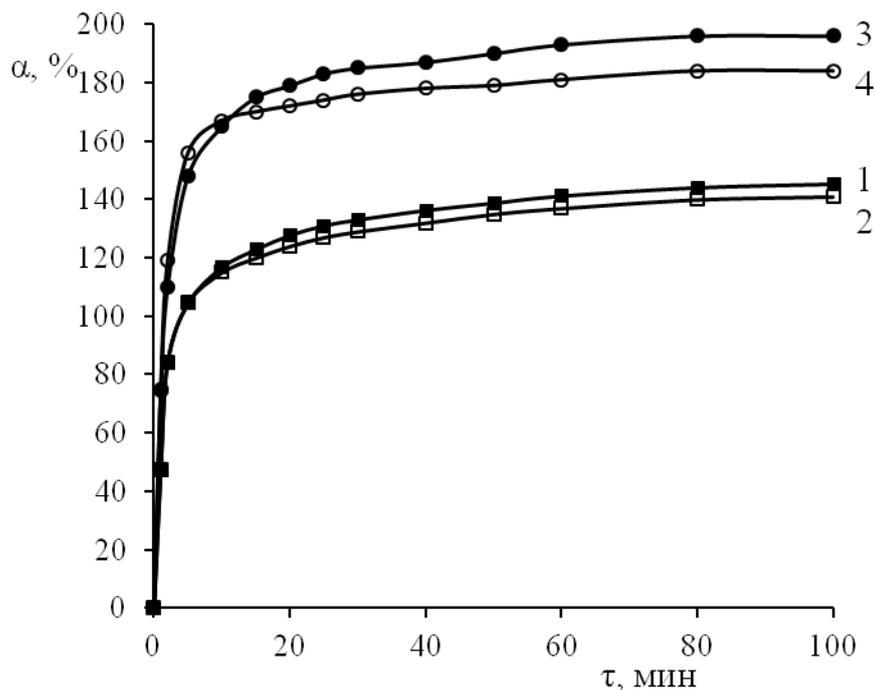


Рисунок 27 – Кинетика набухания модифицированных полифосфатами хитозановых пленок в воде (1,3) и 0,9% -ном растворе NaCl (2,4). Условия модификации: 1, 2 - ПФ 1,0%, 15 минут; 3, 4 – ТПФ 0,5%, 30 минут.

На кривых (рисунок 28) видно, что выделение лидокаина из пленки, модифицированной ТПФ в течение 5 минут, происходит быстрее, чем в случае пленки, обработанной 30 минут. При этом количество выделившегося лидокаина первом случае составило 43,6%, а во втором – всего 20% от введенного изначально.

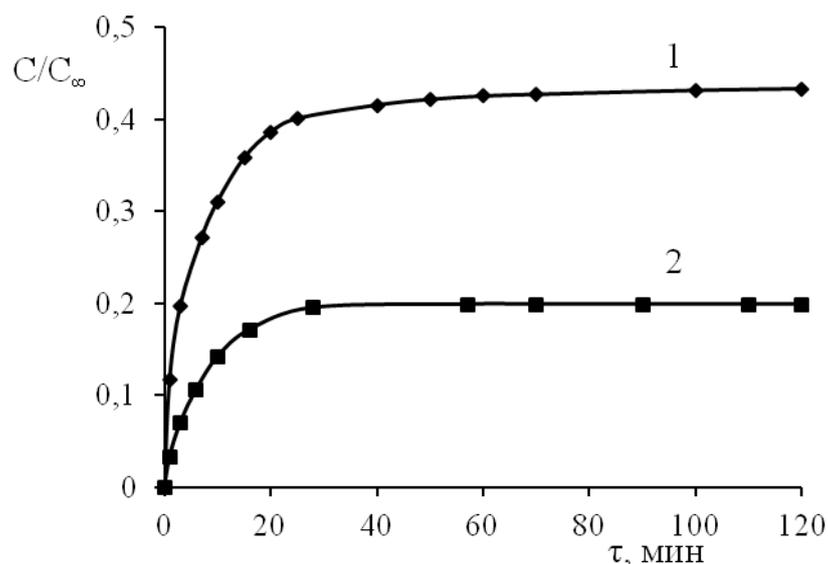


Рисунок 28. Кинетика выделения лидокаина из хитозановой пленки, модифицированной триполифосфатом натрия (0,5%) в течение 5 (1) и 30 минут (2) в 0,9% раствор NaCl.

При использовании в качестве сшивающего реагента пирофосфата калия, количество выделившегося лидокаина составило всего 8-13% (рисунок 29). Это может быть обусловлено низкой степенью набухания пленки. Помимо этого в составе молекулы лидокаина содержатся аминогруппы, способные в процессе сшивания полимера образовывать ионные связи с ионизованными фосфатными группами ТПФ. В связи с этим, часть лидокаина может оставаться в пленке. Причем чем дольше проводится обработка ионным сшивающим реагентом, тем большая его часть остается в пленке.

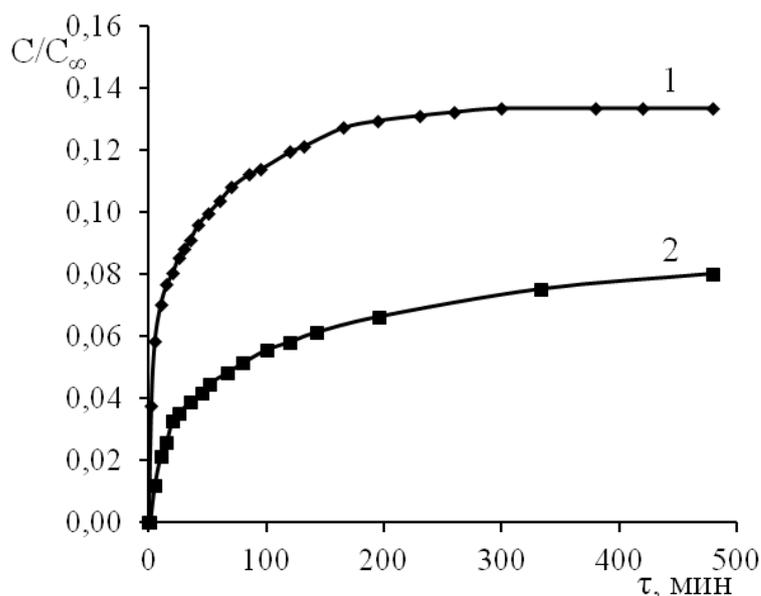


Рисунок 29 – Кинетика выделения лидокаина из хитозановой пленки, обработанной пиррофосфатом калия (1,0%) в течение 5 (1) и 30 минут (2) в 0,9% раствор NaCl.

Возможность взаимодействий ТПФ и лидокаина была исследована с помощью ИК-спектроскопии. Как видно из рисунка 30, спектр лидокаина содержит большое число хорошо разрешенных колебательных полос, основные из которых:  $\nu(\text{NH})$  амидной и аминной групп –  $3472 \text{ см}^{-1}$ ,  $3390 \text{ см}^{-1}$ ,  $3188 \text{ см}^{-1}$ ,  $3020 \text{ см}^{-1}$ ;  $2968$ ,  $2920 \text{ см}^{-1}$  –  $\nu(\text{CH}_3)$  и  $\nu(\text{CH}_2)$ ; колебания  $\nu(\text{C}=\text{O})$  карбонильной группы –  $1678 \text{ см}^{-1}$ ;  $1546 \text{ см}^{-1}$  – колебания  $\nu(\text{C}=\text{C})$  фенильного кольца; деформационные плоскостные колебания  $\delta(\text{CH}_3)$  и  $\delta(\text{CH}_2)$  при  $1478 \text{ см}^{-1}$ ,  $1376 \text{ см}^{-1}$  и внеплоскостные колебания  $788 \text{ см}^{-1}$   $\delta(\text{CH})$ . Гидрохлоридная форма лидокаина предполагает протонирование третичного атома азота и делает возможным взаимодействие лидокаина с ТПФ, что сопровождается изменениями в ИК спектре образца, полученного со-осаждением лидокаина и ТПФ (спектр 3, рисунок 30). В спектре 3 наблюдается появление новых полос поглощения в диапазоне, характерном для колебаний  $\nu(\text{P}=\text{O})$  -  $1210 \text{ см}^{-1}$ ,  $\nu(\text{PO}_2)$  -  $1168 \text{ см}^{-1}$ ,  $\nu(\text{PO}_3)$  –  $1124 \text{ см}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{POP})$  –  $918 \text{ см}^{-1}$ , и деформационных колебаний  $\delta(\text{PO}_2)$  при  $788$ ,  $764$ ,  $716 \text{ см}^{-1}$ , и  $\delta(\text{POP})$  мостиковых групп при  $536 \text{ см}^{-1}$ . При этом спектр 3 не является суперпозицией спектров 1 (лидокаина) и 2

(ТПФ): по сравнению со спектром ТПФ все эти полосы сдвинуты в область высоких частот, что может указывать на достаточно прочные Р-О связи.

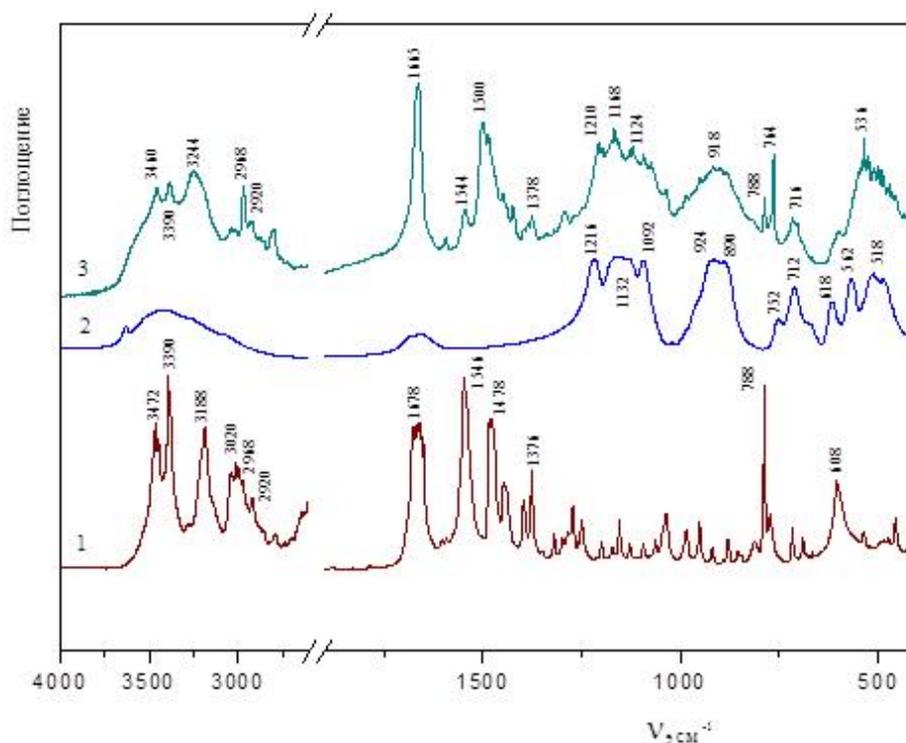


Рисунок 30 – Фурье ИК спектры лидокаина гидрохлорида (1); триполифосфата натрия (2); соосажденных из общего раствора лидокаина и ТПФ (3)

Для придания полимерному материалу антимикробной активности в формовочный раствор вводили антимикробное вещество мирамистин (0,5% ЛВ от массы полимера). Пленки обрабатывали 0,5%-ным раствором триполифосфата натрия (рисунок 31) или 1,0% раствором пиррофосфата калия (рисунок 32) с рН 6 в течение 5 и 30 минут.

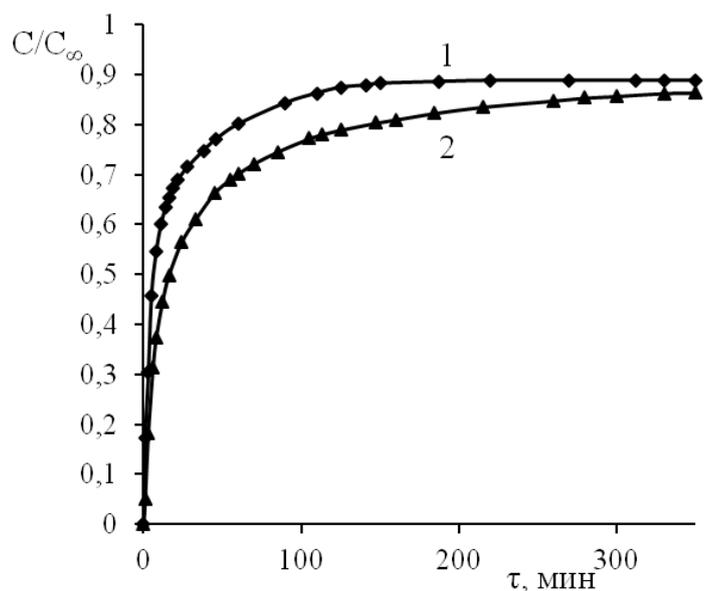


Рисунок 31 – Кинетика выделения мирамистина из хитозановой пленки, модифицированной 0,5%-ным раствором триполифосфата натрия в течение 5 (1) и 30 минут (2)

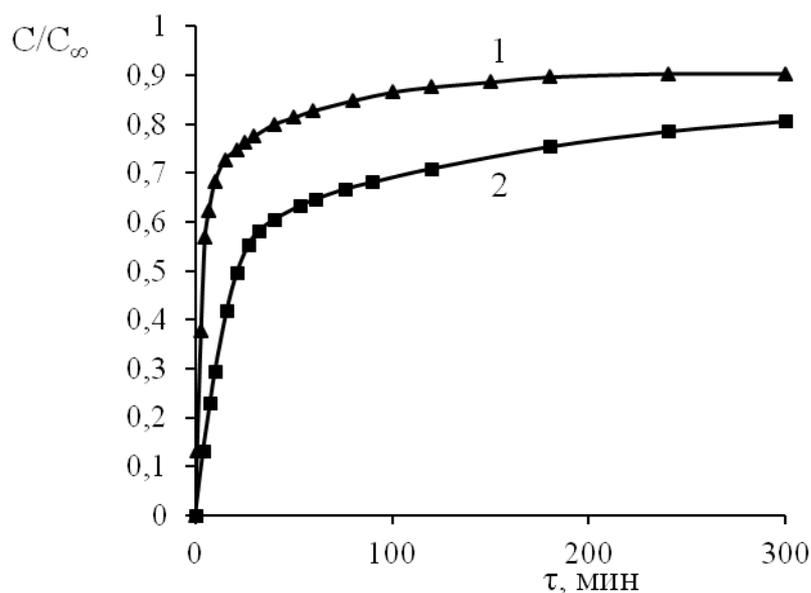


Рисунок 32 – Кинетика выделения мирамистина из хитозановой пленки, модифицированной 1,0%-ным раствором пирофосфата калия в течение 5 (1) и 30 минут (2)

Количество выделившегося мирамистина для всех образцов было примерно одинаковым и составило около 90% от введенного в пленку. Изменение времени обработки пленок ТПФ от 5 до 30 минут позволяет увеличивать

время высвобождения ЛВ от 2,5 до 6 часов и почти до 8 часов при использовании вместо ТПФ пирофосфата калия (рисунки 31, 32).

Таким образом, обоснование условий модификации пленок на основе хитозана полифосфатами позволило получить не растворимые в воде биополимерные пленки с низким влагопоглощением и регулируемой кинетикой выделения биологически активных соединений лидокаина или мирамистина. Однако процесс получения таких пленок включает помимо формирования лекарственно-наполненной пленки дополнительную стадию обработки водным раствором ионного сшивающего реагента и высушивание пленки - процессы, которые помимо потери пленкой растворимости в воде могут вызывать ее коробление за счет неравномерной усадки.

### **3.1.4 Получение хитозановых пленок из формовочных композиций, содержащих полифосфаты**

Была изучена возможность получения пленок путем добавления ТПФ в формовочный раствор. Модифицированные пленки получали из 2% растворов хитозана, содержащих ПФ или ТПФ, в условиях (соотношение функциональных групп, температура), не вызывающих помутнение раствора. При введении сшивающих реагентов в более концентрированный раствор ХТЗ (4%) вследствие высокой вязкости среды сшивающие реагенты не успевают распределиться в объеме фазы, поэтому сшивка ТПФ (в отличие от диальдегидов) вызывает быструю коагуляцию в месте введения 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 соот-

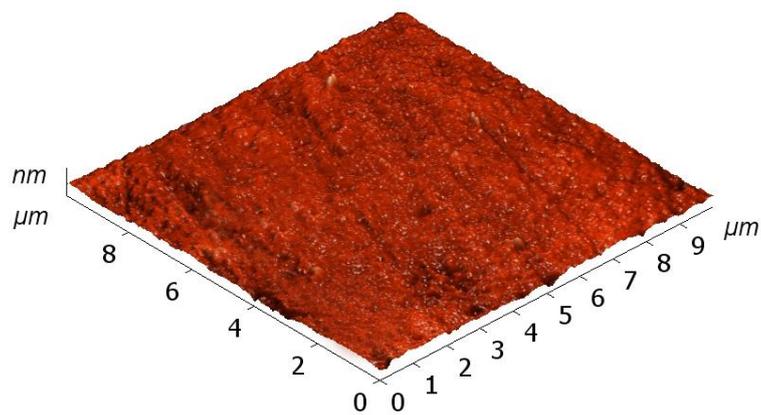
ношения  $[\text{ПФ}]/[\text{NH}_2]$  можно в необходимых пределах изменять степень набухания и растворимость пленки.

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 изменения в морфологии модифицированной пленки по сравнению с пленкой, полученной в отсутствие сшивающего реагента.

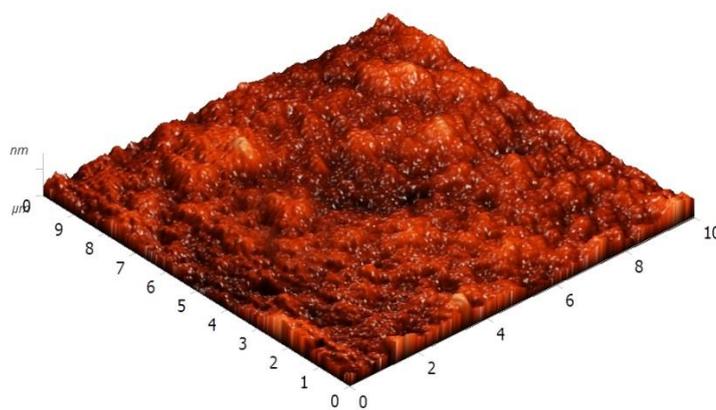
#### **3.1.4.1 Исследование морфологии поверхности пленок**

На рисунке 33 представлены АСМ изображения поверхности хитозановой пленки, полученной без использования сшивающих реагентов и в присутствии ПФ, введенного в раствор хитозана при температуре  $60^\circ\text{C}$  и различных соотношениях  $[\text{ПФ}]/[\text{NH}_2]$ . Как видно из представленных данных, пленка, полученная из растворов хитозана, имеет более гладкую поверхность (рисунок 33а) по сравнению с пленками, содержащими сшивающий реагент. По-видимому, сшивка макромолекулярных цепей приводит к формированию надмолекулярных образований в виде частиц новой фазы, размер которых зависит от соотношения  $[\text{ПФ}]/[\text{NH}_2]$  (рисунки 33б и 33в).

а



б



в

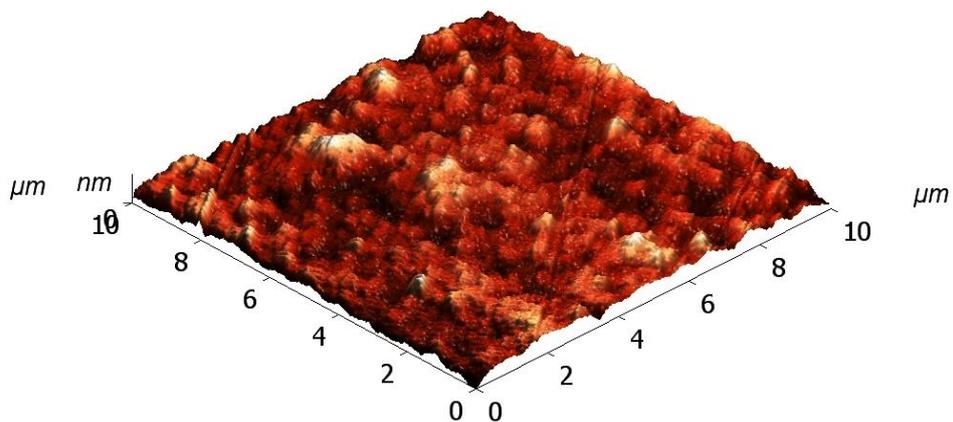


Рисунок 33 – АСМ изображения пленки из хитозана (а) и пленок из хитозана, содержащих ПФ при соотношении  $[\text{ПФ}]/[\text{NH}_2] = 0,052$  (б),  $[\text{ПФ}]/[\text{NH}_2] = 0,072$  (в).

Внутренняя структура пленки, содержащей ПФ, была визуализирована на микроскопектронетре inVia Reflex, Renishaw (Великобритания). Как видно из рисунка 34, в структуре пленки, как и на ее поверхности, присутствуют частицы фазы сшитого хитозана размером около 1 мкм. Частицы сгруппированы в определенные структуры. Взаимодействия между частицами могут реализоваться как за счет межмолекулярных гидрофобных взаимодействий, так и электростатических взаимодействий противоположно заряженных функциональных групп.

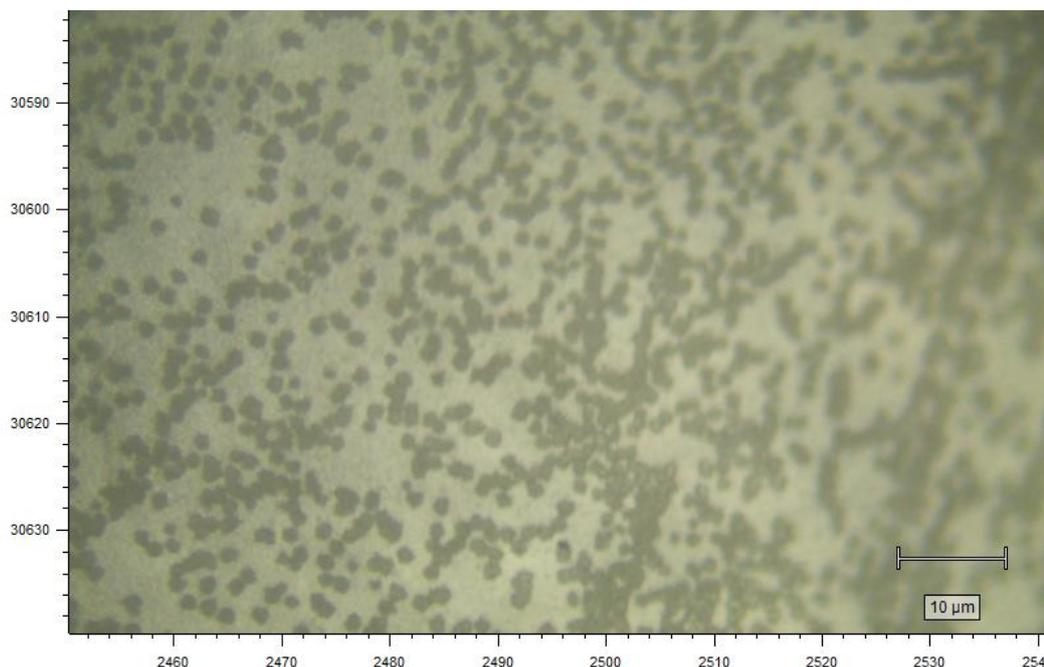


Рисунок 34 – Внутренняя структура пленки, содержащей ПФ (рамановская спектроскопия) при разном увеличении.

Размер частиц внутри пленки превышает размер поверхностных образований. Однако, это можно отнести к тому, что данные получены с использованием разных методов визуализации.

#### **3.1.4.2 Изучение набухания и растворимость пленок, полученных из растворов хитозана, содержащих полифосфаты**

При увеличении соотношения  $[ПФ]/[NH_2]$  от 0,052 до 0,173 растворимость пленок уменьшается почти в 2 раза и значительно снижается степень

набухания пленок (таблица 4). Это связано с увеличением плотности сшивки хитозана с увеличением содержания ПФ.

Таблица 4 – Степень набухания и растворимость пленок на основе хитозана (4%), содержащего ПФ при различных соотношениях [ПФ]/[NH<sub>2</sub>]

Соотношение [ПФ]/[NH <sub>2</sub> ]	Степень набухания, %	Растворимость, %
0,052	3500	55
0,072	1330	43
0,115	1050	38
0,144	760	31
0,173	480	24

В отличие от ПФ введение в 4%-ный раствор хитозана ТПФ, молекула которого в большей степени ионизована, было невозможно даже при повышенной температуре. Снижение вязкости раствора (при использовании 2% раствора хитозана) позволило ввести в формовочный раствор ТПФ и получить высоконабухающую пленку (рисунок 35). Соотношение [ТПФ]/[NH<sub>2</sub>] в пленке составило всего 0,036 моль/моль, поэтому полученная пленка обладала высокими осмотическими свойствами: равновесная степень набухания в воде составила 6780% (рисунок 35).

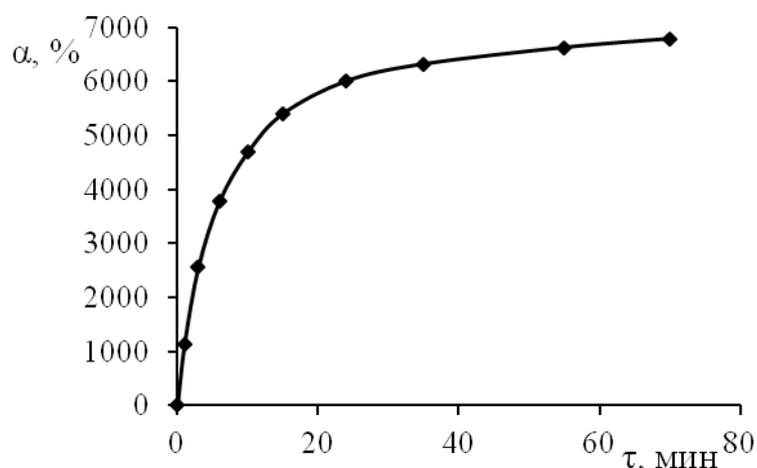


Рисунок 35 – Кинетика набухания пленки, полученной из 2% хитозана в 2%-ном растворе уксусной кислоты в присутствии ТПФ ([ТПФ]/[NH<sub>2</sub>] = 0,036)

При введении в раствор хитозана ПФ при таком же соотношении ( $[\text{ПФ}]/[\text{NH}_2] = 0,036$ ) привело к получению полностью растворимой в воде пленки. Соответственно при использовании ПФ для того, чтобы произошла сшивка необходимо вводить большее количество сшивающего реагента.

### **3.1.5 Получение и свойства лекарственно-наполненных хитозановых пленок, модифицированных полифосфатами путем введения в формочный раствор**

Пленки из хитозана с высокой влагоудерживающей способностью перспективны для использования в качестве раневых покрытий [132]. При этом для придания анестезирующего действия или антимикробных свойств в их состав целесообразно вводить лекарственные вещества. В качестве биологически активных соединений для введения в состав пленок из хитозана, модифицированного пирофосфатом калия, использовали мирамистин или лидокаин.

Кинетика выделения лекарственных веществ является одним из важнейших параметров лекарственно-наполненных материалов, который определяет их фармакодинамические свойства. На рисунках 36 и 37 приведены кинетические кривые выделения лидокаина или мирамистина из пленок на основе хитозана, полученных из общего раствора полимера и биологически активного вещества, содержащего ПФ.

Как видно из рисунка 36, с увеличением соотношения  $[\text{ПФ}]/[\text{NH}_2]$  с 0,052 до 0,115 выделение лидокаина из хитозановой пленки, содержащей ПФ происходит медленнее. Это может быть обусловлено уменьшением степени набухания пленки, содержащей большее количество ПФ (таблица 4). При этом количество выделившегося лидокаина было небольшим и составило в первом случае 10% от введенного в пленку, а во втором – 15%. Причиной этого могут быть ионные взаимодействия лидокаина с ионизованными фосфатными группами связанного с хитозаном пирофосфата калия. Поэтому,

часть лидокаина может оставаться в пленке. Причем чем больше сшивающего реагента содержится в пленке, тем большая его часть остается.

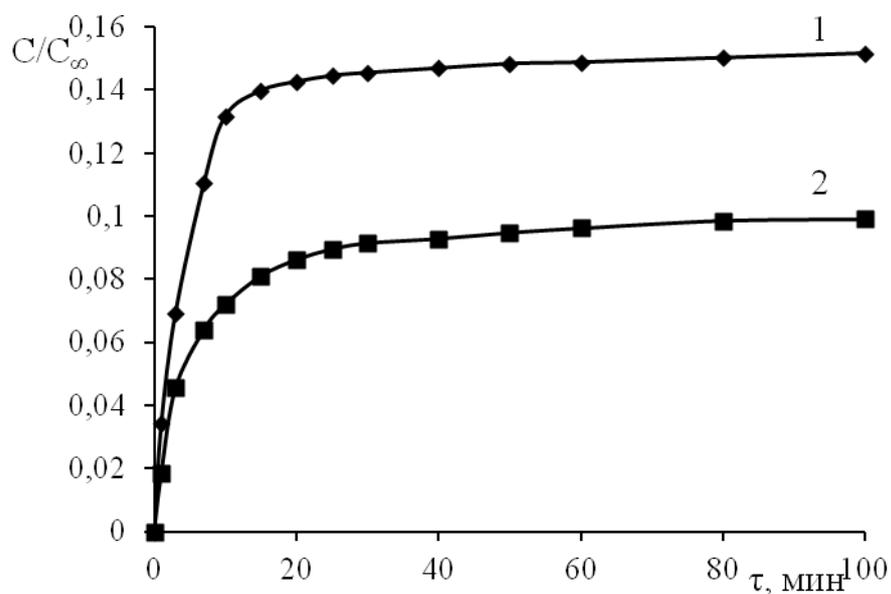


Рисунок 36 – Выделение лидокаина из модифицированной хитозановой пленки. Соотношение  $[ПФ]/[NH_2]$  0,052 (1) и 0,115 (2).

При использовании мирамистина как и в случае лидокаина, скорость выделения мирамистина снижается при увеличении соотношения  $[ПФ]/[NH_2]$  от 0,052 до 0,115 (рисунок 37). При этом за одно и то же время из пленок выделяется 75% и 65% биологически активного вещества при соотношении  $ПФ/NH_2$  0,052 и 0,115 соответственно. Этот факт может быть связан с особенностями строения мирамистина, определяющими его растворимость в воде и поверхностно-активные свойства.

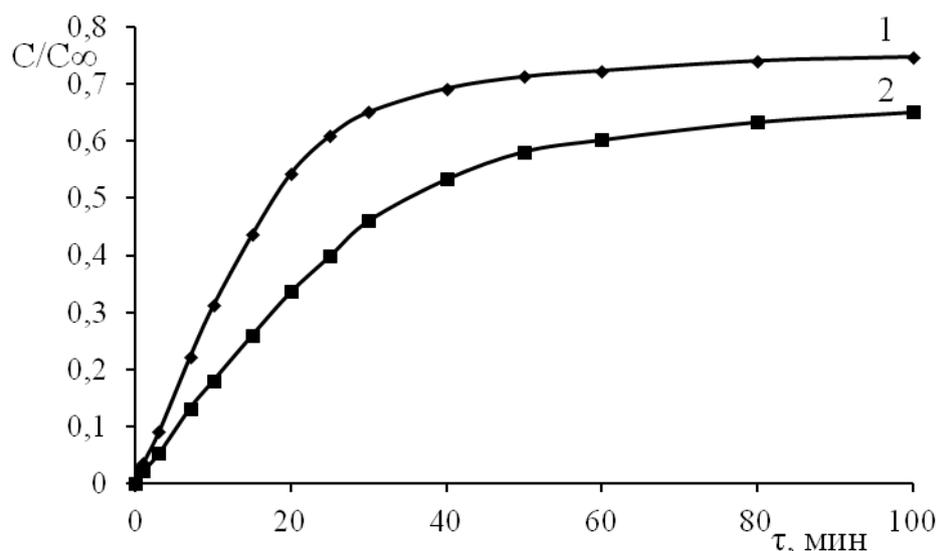


Рисунок 37 – Кинетика выделения мирамистина из модифицированной хитозановой пленки. Соотношение ПФ/НН<sub>2</sub>: 0,052 (1), 0,115 (2)

Как видно из рис. 37, за счет изменения количества введенного в раствор полимера сшивающего реагента можно воздействовать не только на влагопоглощение пленок из хитозана, но и скорость выделения различных водорастворимых лекарственных соединений. Разработанный способ получения сшитых хитозановых пленок путем введения ионного полифункционального соединения непосредственно в формовочный раствор хитозана в водном растворе уксусной кислоты может использоваться при разработке лекарственно-наполненных материалов с высоким влагопоглощением (раневых покрытий, систем с контролируемым выделением лекарственных соединений).

\*\*\*

Таким образом, в главе 3.1 на примере триполифосфата и пирофосфата показано, что использование различных способов модификации хитозана ионными сшивающими реагентами позволяет получать наночастицы хитозана или пленки с заданными высоким или низким влагопоглощением, растворимостью и скоростью выделения лекарственных веществ. Технологические параметры получения и свойства поверхностно- и объемно-модифицированных лекарственно-наполненных пленок из хитозана приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Параметры получения и свойства лекарственно-наполненных пленок из хитозана, полученных с использованием ионных сшивающих реагентов

Способ модификации	Технологические параметры					Свойства пленок	
	Сшивающий реагент (СР)	рН	Концентрация СР/ХТЗ, %	СР/NH <sub>2</sub> , 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

### 3.2 Модификация хитозана с помощью ковалентных сшивающих реагентов

Материал, функционирующий в живом организме, должен обладать сходными с находящимися в контакте с ним тканями физико-механическими свойствами - мягкостью, упругостью, эластичностью. Поэтому с точки зрения биомиметики для лечения повреждений мягких тканей наиболее подходящими являются гидрогели с высокой влагоудерживающей способностью.

Ковалентное сшивание хитозана в водных растворах бифункциональными реагентами приводит к формированию непрерывной сетки геля, обеспечивающей прочность и одновременно свободную диффузию воды. Гидрогели благодаря гидрофильности и высокопористой структуре способны сорбировать и удерживать до 10000% воды или биологических жидкостей. Свойства гидрогелей позволяют создавать на их основе новые материалы биотехнологического, фармакологического и медицинского назначения [4].

Наиболее распространенным ковалентным сшивающим реагентом для хитозана на сегодняшний день является глутаровый альдегид (ГА). В процессе взаимодействия его с хитозаном помимо сшивки полисахаридных цепей, происходит также альдольная конденсация ГА [10], которая приводит к появлению продуктов нерегулярного строения [133]. Как уже было указано выше, высокая токсичность получаемых продуктов, является основным препятствием при применении материалов, сшитых ГА, в медицине.

Как было показано в литературном обзоре для химической сшивки хитозана используют большое число ковалентных сшивающих реагентов. Однако особый интерес с точки зрения медицинского использования в последнее время представляет сшивающий реагент природного происхождения дженипин (Gr).

С целью получения на основе хитозана материалов медико-биологического назначения были исследованы закономерности взаимодействия хитозана с дженипином и гелеобразования в растворах хитозана в присутствии сшивающего реагента при различных условиях. Особенности гелеобразования и сшивки хитозана Gr позволят оптимизировать технологические параметры получения пленок с высокой влагоудерживающей способностью и высокопористых гидрогелевых матриц.

### **3.2.1 Исследование процесса гелеобразования в растворах хитозана в присутствии природного сшивающего реагента дженипина**

Учитывая, что гелеобразование в растворах хитозана в присутствии ковалентных сшивающих реагентов наиболее подробно изучено на примере глутарового альдегида [96, 134, 135], исследование процесса гелеобразования хитозана в присутствии Gr было выполнено в сравнении с ГА.

#### **3.2.1.1 Влияние состава композиций и условий реакции на продолжительность гелеобразования в растворах хитозана**

Процесс гелеобразования хитозана в присутствии дженипина и ГА был изучен в широком диапазоне pH (4,0 – 6,4) и молекулярных массах хитозана

(95 – 320 кДа), при различных мольных соотношениях сшивающего реагента к аминоксодержащему элементарному звену хитозана в сравнении с ГА.

pH оказывает определяющее влияние на реакционную способность хитозана. В макромолекулярной цепи хитозана содержатся реакционноспособные аминогруппы, определяющие возможность его модификации, а в протонированной форме они придают полимеру растворимость в воде. Хитозан способен растворяться в водной кислой среде, в результате чего приобретает положительный заряд благодаря группам  $-\text{NH}_3^+$ . В реакциях нуклеофильного присоединения реакционноспособной, напротив, является депротонированная форма аминогруппы. Известно [106], что формирование гетероциклического соединения Gr связанного с глюкозаминным остатком хитозана или аминокислотным остатком, входящим в состав белка, происходит в результате нуклеофильной атаки первичной аминогруппы на C3 углеродный атом Gr, поэтому реакционная способность хитозана в реакции с дженипином должна зависеть от числа депротонированных аминогрупп. При уменьшении концентрации ионов водорода растет число депротонированных аминогрупп и их реакционная способность в реакциях с Gr и ГА. В то же время растворимость хитозана в водных растворах одноосновных кислот также определяется степенью протонирования аминогрупп ( $\text{pK}_a$  хитозана лежит в интервале 6,2-6,5 в зависимости от содержания остаточных N-ацетильных групп). Так, например, прямым растворением в растворе уксусной кислоты могут быть получены растворы с pH не выше 4,8-5,0. С целью увеличения числа депротонированных аминогрупп в растворе хитозана и скорости реакции сшивки хитозана был использован прием, позволивший потенциометрически довести значение pH исходного 2%-го раствора хитозана в 2%-й уксусной кислоте с 3,8 до значений выше 5,0. Изучение влияния pH на процесс гелеобразования было проведено на примере растворов с pH 3,8, 5,6 и 6,4 (дальнейшее увеличение pH вызывало необратимое осаждение полимера) [136].

Увеличение рН привело к увеличению скорости гелеобразования по сравнению с описанными в литературе результатами, согласно которым процесс сшивки хитозана дженипином длится от нескольких часов до нескольких суток [106, 137.]. На рисунке 38 приведены зависимости времени гелеобразования от содержания Gr в растворах хитозана с различным значением рН. Увеличение рН с 3,8 до 5,6, что соответствует степени протонирования 100% и 82% [138], ускорило процесс гелеобразования: при соотношении Gr/NH<sub>2</sub> 0,02 моль/моль и рН 5,6 гель образовался за 3 часа, а при рН 3,8 этот процесс занимал уже 15 часов (кривые 1 и 2, рисунок 18). Эффект от дальнейшего увеличения рН до 6,4 (степень протонирования 43%) оказался не столь значительным (кривая 3), так как для потери системой способности к течению в результате сшивки достаточно 1% от общего числа аминокрупп [138].

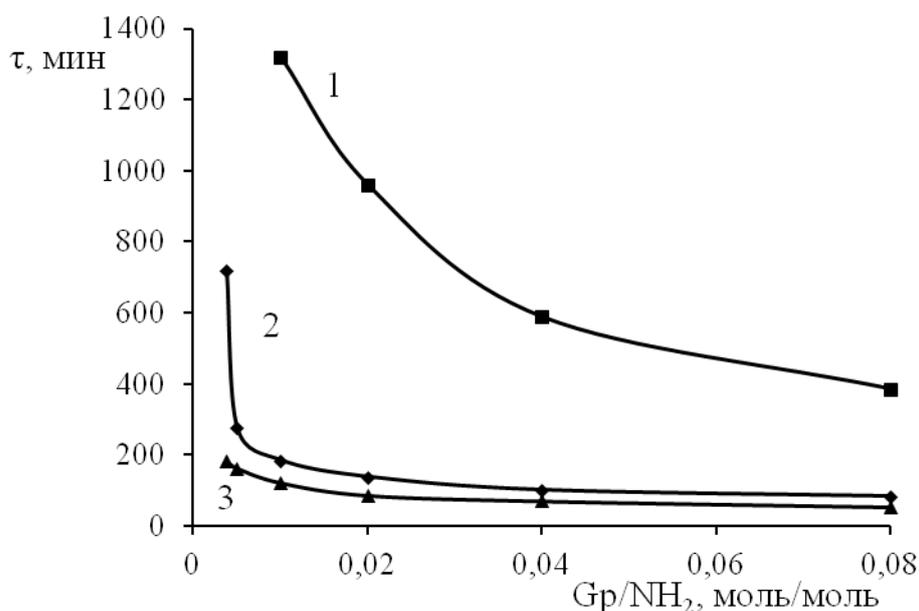


Рисунок 38 – Влияние рН на время гелеобразования (τ) в растворах хитозана при разных соотношениях дженипин – аминокгруппа хитозана (Gr/NH<sub>2</sub>). рН:

1- 3,8; 2 -5,6; 3 - 6,4. ММ хитозана 190 кДа.

Рост молекулярной массы хитозана приводил к уменьшению времени образования геля при всех исследуемых концентрациях дженипина (рисунок 39) в результате уменьшения трансляционной подвижности макромолекул в

растворе и усиления межмолекулярных взаимодействий между полимерными цепями большей длины, вследствие чего для потери системой способности к течению оказалось достаточно меньшего числа химических сшивок. Так, в растворах хитозана с ММ 320 кДа при добавлении Gr в количестве 8 ммоль/моль NH<sub>2</sub> время гелеобразования составило 2,5 часа, что почти в 5 раз меньше, чем при использовании хитозана с ММ 95 кДа (рисунок 39). Полученные результаты являются закономерными, так как для прекращения подвижности макромолекул в более структурированном растворе полимера с высокой ММ необходимо меньшее число сшивок. При этом добавление дженипина в количестве менее 8 ммоль/моль NH<sub>2</sub> в раствор хитозана с низкой ММ (95 кДа) не приводило к гелеобразованию даже в течение суток.

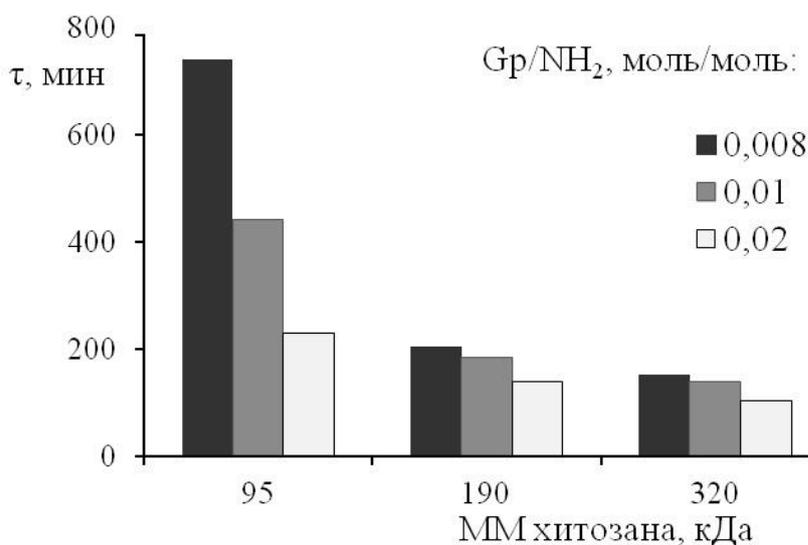


Рисунок 39 – Влияние молекулярной массы хитозана на время гелеобразования ( $\tau$ ) в растворах хитозана, содержащих дженипин.

Исследование влияния температуры системы на процесс гелеобразования (рисунок 40) показало, что увеличение температуры системы от 25<sup>0</sup>С до 60<sup>0</sup>С также приводило к существенному снижению времени гелеобразования от 3 часов до 30 минут при соотношении Gr/NH<sub>2</sub> 0,01 моль/моль, концентрации хитозана 2,0% и pH 5,6.

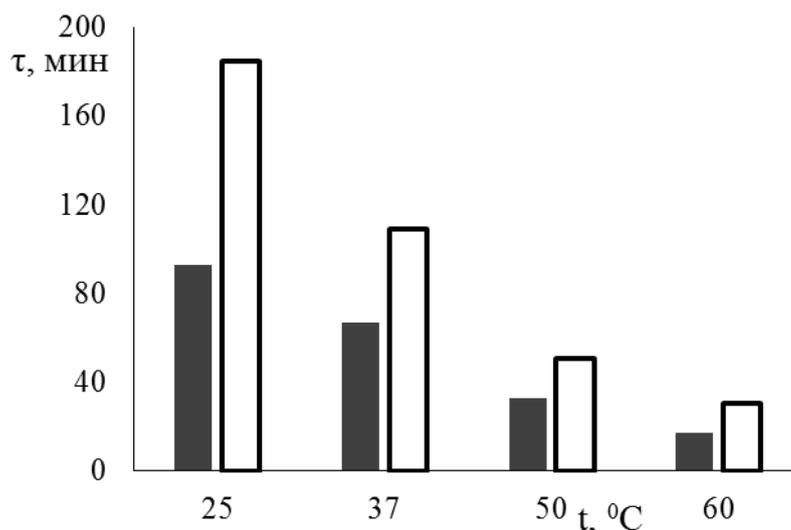
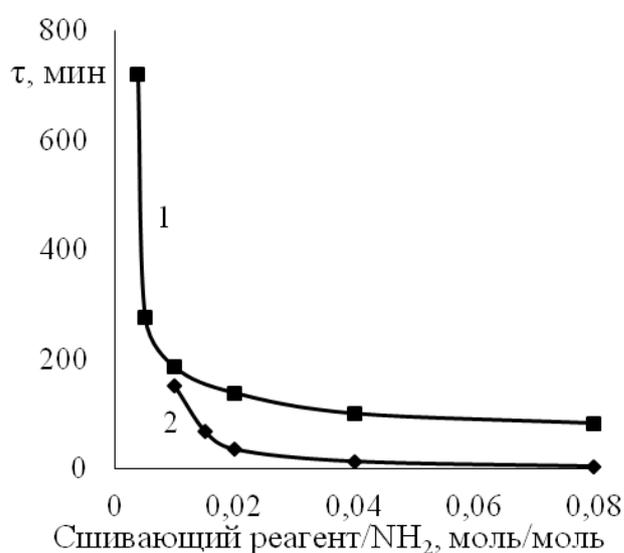


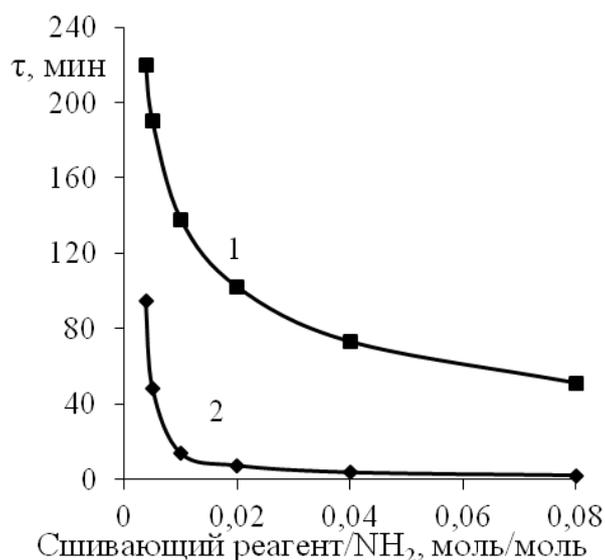
Рисунок 40 – Влияние температуры системы на время гелеобразования в растворах хитозана (ММ 190 кДа, концентрация 2,0%, pH 5,6), содержащих Gr в количестве 0,05 моль/моль NH<sub>2</sub> (■) и 0,01 моль/моль NH<sub>2</sub> (□).

На рисунке 41 представлены зависимости времени гелеобразования от содержания дженипина в сравнении с глутаровым альдегидом для двух молекулярных масс хитозана. Как видно из рисунков, ГА сшивает макромолекулы хитозана значительно быстрее: для сшивки хитозана ГА необходимо всего 7 минут при содержании сшивающего реагента 0,02 моль на моль NH<sub>2</sub>, в то время как при использовании Gr в аналогичных условиях требуется более полутора часов. Это обусловлено тем, что механизм реакции между хитозаном и Gr включает две стадии: быстрая первая реакция протекает в результате стадийного механизма сшивки дженипином, при котором включение аминогруппы хитозана в состав гетероцикла дженипина - это всего лишь первая стадия [8], и только накопление продукта этой реакции запускает процессы, приводящие к сшивке макромолекул.

Увеличение ММ от 190 до 320 кДа приводит к уменьшению времени гелеобразования в присутствии ГА, как и в случае использования Gr (Рисунок 41).



А



Б

Рисунок 41 – Влияние количества сшивающего реагента на время гелеобразования в растворах хитозана (ММ 190 кДа (А) и 320 кДа (Б), концентрация 2,0%, рН 5,6) при использовании в качестве сшивающего реагента

Gr (1) или GA (2)

В описанных экспериментах использовались эквипонцентрированные растворы хитозана, но изменение ММ при этом привело к существенному изменению вязкости раствора. В следующей серии экспериментов изучение процесса гелеобразования проводили как в эквипонцентрированных (ММ 320 кДа, концентрация 2% и ММ 190 кДа, концентрация 2%), так и в эквивязких (ММ 320 кДа, концентрация 2% и ММ 190 кДа, концентрация 3,2%) растворах хитозана (рисунок 42). Было установлено, что повышение концентрации полимера (и, соответственно, концентрации аминогрупп) в большей степени влияет на скорость гелеобразования, чем повышение вязкости, характеризующей снижение подвижности макромолекулярных цепей.

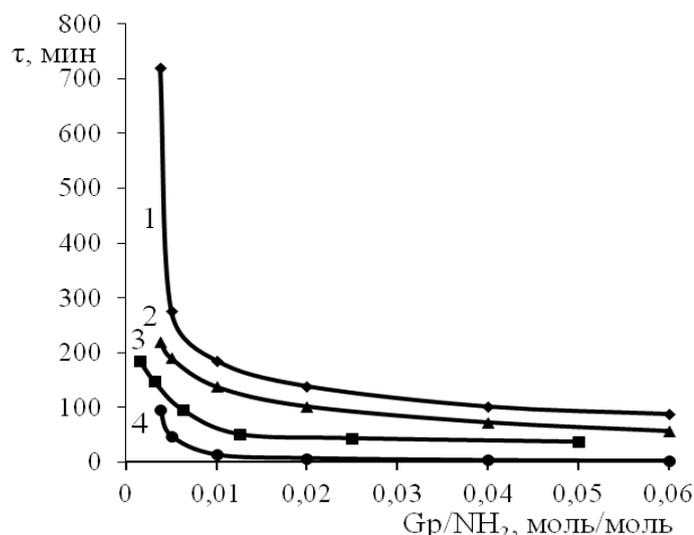


Рисунок 42 – Влияние соотношения сшивающей реагент – аминокетильная группа хитозана ( $G_r(NH_2)$ ) на время гелеобразования ( $\tau$ ) в растворах хитозана при разной концентрации и ММ хитозана (рН 5,6). 1- Концентрация раствора хитозана 2%, ММ хитозана 190 кДа, сшивающий реагент дженипин; 2- Концентрация раствора хитозана 2%, ММ хитозана 320 кДа, сшивающий реагент дженипин; 3- Концентрация раствора хитозана 3,2%, ММ хитозана 190 кДа, сшивающий реагент дженипин; 4 - Концентрация раствора хитозана 2%, ММ хитозана 320 кДа, сшивающий реагент ГА. Вязкость растворов хитозана ( $\eta$ ) 0,35 Па·с (1) и 4,5 Па·с (2-4).

### 3.2.1.2 Исследование кинетики изменения вязкости в процессе сшивки хитозана Gr или ГА

Сравнительное исследование кинетики роста вязкости системы 2%-ный раствор хитозана (рН 5,6) – сшивающий реагент в присутствии эквимольных количеств ГА и Gr показало, что кинетические кривые  $\eta=f(t)$  характеризуются наличием нескольких участков, различающихся скоростью изменения вязкости. При добавлении сшивающего реагента к раствору хитозана образование ковалентных связей между молекулами ГА или Gr и отдельными макромолекулами аминополисахарида приводило к модификации полимера и изменениям вязкости, которые связаны с увеличением молекулярной массы хитозана. В этот период в растворе образовывались ковалентно зафиксированные агрегаты макро-

молекул, рост размеров которых проявлялся во всё возрастающем изменении вязкости. Когда агрегаты модифицированного полимера достигали определённых размеров, они взаимодействовали между собой, что вызывало резкое увеличение вязкости системы. Последний период заканчивался образованием пространственной структуры сшитого геля во всём объёме системы и характеризовался отсутствием течения в условиях деформирования.

Как видно из рисунка 43, дженипин как сшивающий реагент демонстрировал меньшую эффективность в реакции с хитозаном (ММ 190 кДа) по сравнению с ГА, что подтвердило полученные ранее данные (рисунок 21). Так, время начала гелеобразования при использовании эквимольных количеств Gr и ГА различались на порядок (кривые 1 и 4, рисунок 43). Снижение pH раствора хитозана приводило к резкому замедлению процесса гелеобразования почти в 5 раз (кривые 3 и 5, рисунок 43). При увеличении же ММ хитозана (кривые 3 и 4, рисунок 43), как и концентрации раствора хитозана, приводящим к увеличению вязкости раствора (кривые 2 и 4, рисунок 43), наблюдалось ускорение гелеобразования.

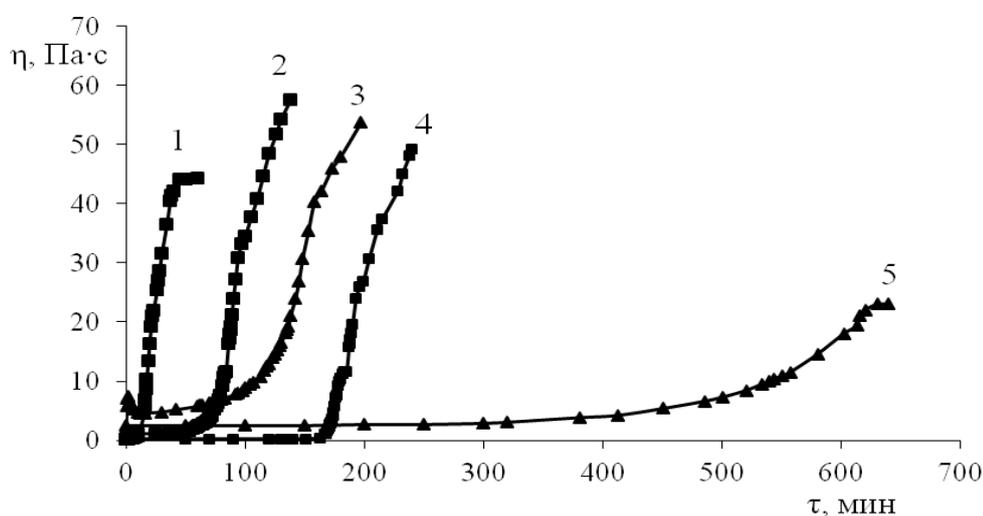


Рисунок 43 – Кинетика изменения вязкости в 2%-ном (1, 3-5) и 3,2%-ном (2) растворах хитозана с ММ 190 кДа (■) и 320 кДа (▲) в процессе сшивки ГА (1) или Gr (2-5). pH хитозана 3,8 (5) и 5,6 (1-4), соотношение «ГА(Gr)/NH<sub>2</sub>» 0,02 моль/моль.

### 3.2.1.3 Изучение упругих свойств гидрогелей хитозана, сшитого дженипином

Для характеристики изменения физико-механических свойств свежесформованных гидрогелей хитозана были использованы значения модуля упругости (E), полученного методом сжатия путем ступенчатого нагружения гелей. Кинетика изменения модуля упругости гелей, полученных в разных условиях, была исследована после завершения гелеобразования (рисунок 44). Способность сопротивляться деформированию при сжатии у гидрогелей хитозана (ММ 320 кДа), сшитого Gr, 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 известными особенностями механизма взаимодействия Gr с аминогруппами хитозана, включающего олигомеризацию дженипина [106]. В результате увеличения длины межмолекулярных сшивок возрастает деформируемость гидрогеля (рисунок 44, кривые 1, 4). Наиболее упругие гидрогели были получены при использовании хитозана с ММ 320 кДа.

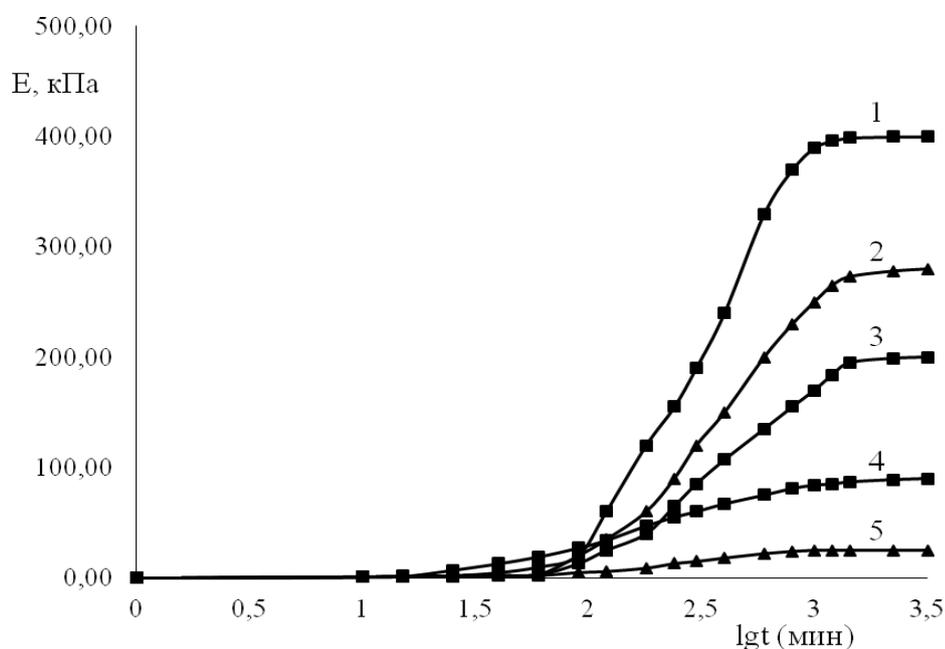


Рисунок 44 – Кинетика изменения модуля упругости (E) сшитых Gr (1,2, 4, 5) или ГА (3) гелей хитозана с ММ массой 190 кДа (▲) и 320 кДа (■) и соотношением Gr(ГА)/NH<sub>2</sub> 0,02 моль/моль (3-5) и 0,08 (1-2) моль/моль.

### 3.2.1.4 Изучение кинетики и механизма взаимодействия хитозана с Gp с использованием электронных спектров поглощения

Добавление раствора дженипина приводит не только к изменению вязкости раствора хитозана, но и появлению поглощения в нескольких диапазонах видимой и ультрафиолетовой областей спектра [106, 112, 139], что позволяет исследовать влияние условий сшивки на разные стадии реакции взаимодействия хитозана с Gp.

Выраженный синий цвет гидрогелей хитозана, сшитого Gp, является результатом индуцированной кислородом воздуха реакции радикальной полимеризации Gp, протекающей как побочный процесс после образования связи между аминогруппой хитозана и дженипином (рисунок 45). Однако образование продуктов взаимодействия хитозана и Gp характеризуется изменением поглощения, прежде всего, в ультрафиолетовой области спектра при 240 и 280 *нм* (рисунок 46).



Исходный раствор



Через час после прибавления Gp



Через два часа после прибавления Gp

Рисунок 45 – Изменения в растворе хитозана в процессе сшивки Gp (Gp/NH<sub>2</sub> 0,08) pH 5,6

В предварительном эксперименте, выполненном в течение двух часов при концентрации раствора хитозана 2% и соотношении Gp/NH<sub>2</sub> 0,08 моль/моль и различном разбавлении, обеспечивающим возможность регистрации поглощения в разных диапазонах спектра излучения, показано снижение поглощения реакционной смеси при 240 *нм* за счет конверсии эфирных групп дженипина и появление нового пика при 280-290 *нм*, который повышался с течением реакции (врезка, рисунок 46). Увеличение поглощения

при 280 нм является характерным признаком образования гетероциклического амина – включения аминогруппы хитозана в гетероцикл дженипина. Следует отметить, что в течение 2-х часов не происходит заметных изменений в спектре в области, соответствующей синему цвету  $\lambda$  600-610 нм, что может быть связано как с низкой скоростью полимеризации Gr, так и небольшим коэффициентом молярного поглощения олигомерного соединения.

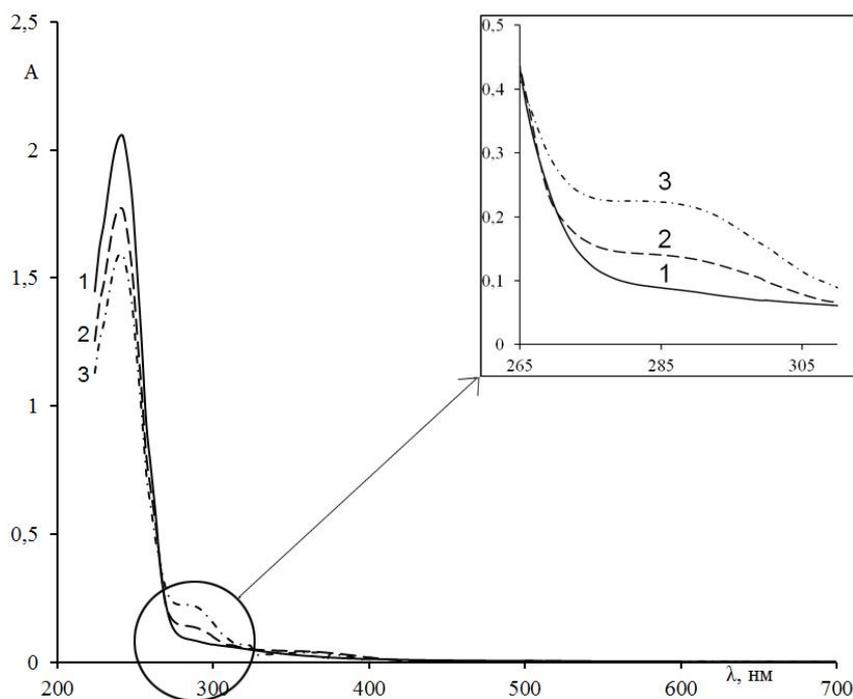


Рисунок 46 - Электронные спектры поглощения раствора хитозана и дженипина: 1 – исходная система; 2 и 3 – спектры, полученные через 1 и 2 часа после начала реакции.

С целью детализация механизма взаимодействия хитозана с дженипином было проведено комплексное исследование кинетики изменения поглощения системы раствор хитозана - дженипин в процессе сшивки хитозана вплоть до точки гелеобразования, а также в свежесформованных пленках, полученных на основе исследуемой системы на кварце из тонкого слоя раствора.

С этой целью был приготовлен раствор путем смешения 15 мл 2,5%-го раствора ХЗ в ацетатном буфере с рН 5,6 и 3,75 мл раствора дженипина (0,24%), соотношение Gr/NH<sub>2</sub> 0,02. Часть этого раствора залили в кювету

толщиной 1 см для непосредственной записи на спектрофотометре (рисунок 47). Из остальной части основного раствора периодически отбирали 0,4 мл и разбавляли в 4,6 мл воды (разбавление в 12,5 раз, обозначен как разбавленный раствор). Запись велась в кювете толщиной 1 см (рисунок 48). Кроме того, 0,5 мл основного раствора вылили в круглую чашку диаметром 2 см. После гелирования образца проводили запись на спектрофотометре (обозначен как пленка кварц).

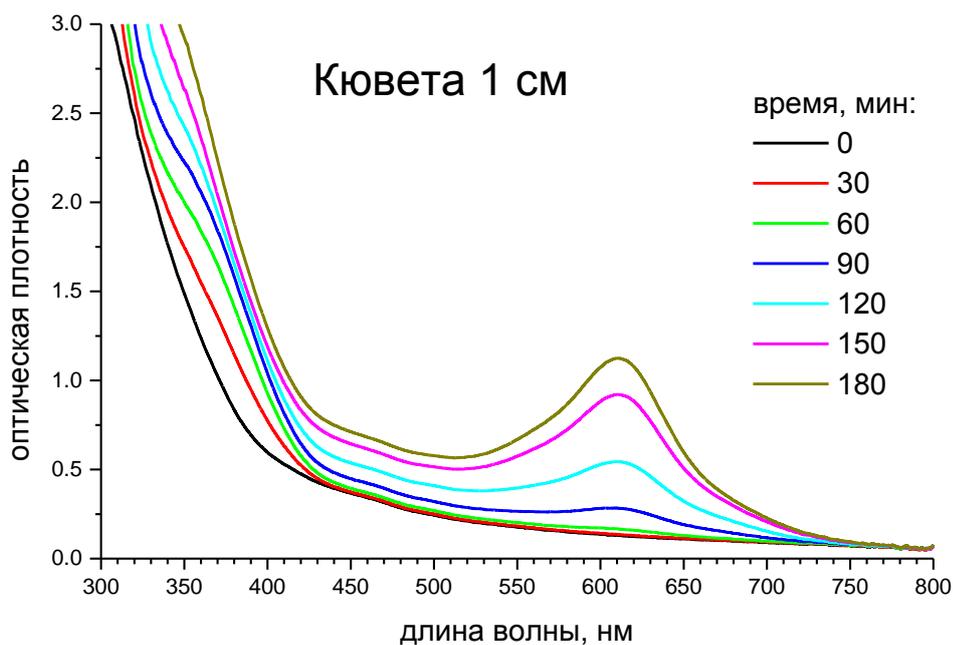


Рисунок 47 – Кинетика изменения оптической плотности в растворе хитозана в процессе реакции с дженипином (непосредственная регистрация - без разбавления).

Как видно из рисунка 47, без разбавления раствора был зафиксирован рост оптической плотности при  $\lambda$  610 нм. Изменение оптической плотности при других длинах волн проводили при разбавлении раствора 12,5. Через 90 минут после начала реакции происходило увеличение вязкости раствора, что через 120 минут и через 180 минут после начала реакции делало невозможным провести разбавление раствора, поэтому последующая регистрация поглощения проводилась на пленке, сформованной на кварце, имеющей структуру геля.

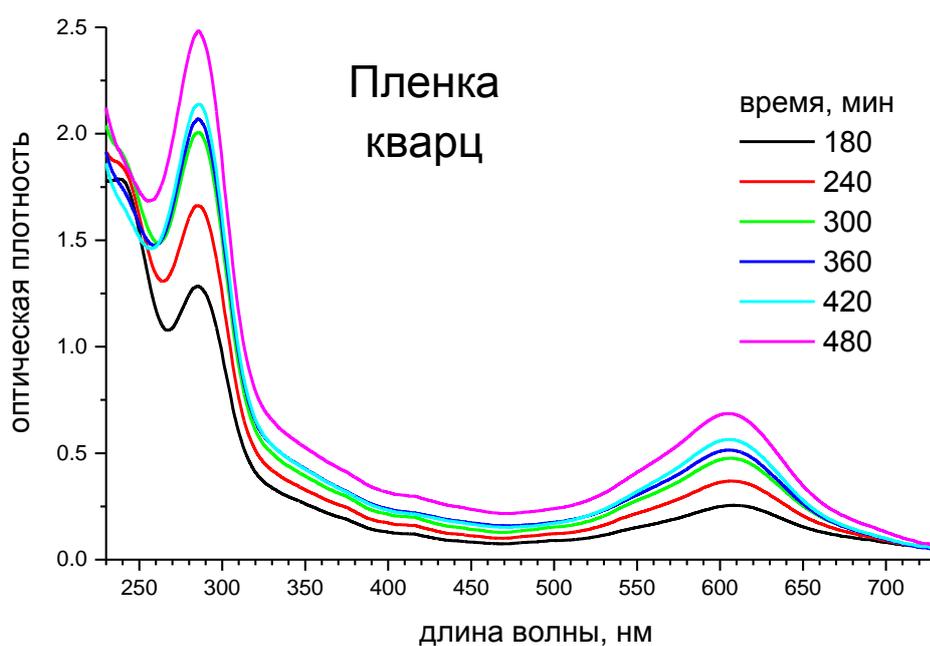
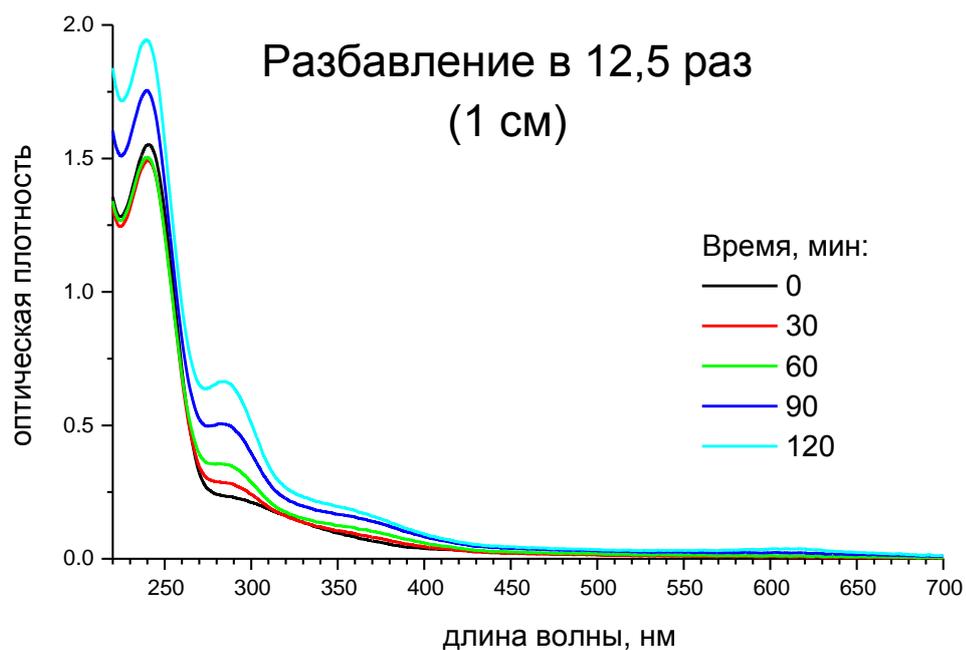


Рисунок 48 – Электронные спектры поглощения раствора хитозана, содержащего дженипин, в процессе его реакции с дженипином при разбавлении 12,5 (вверху) и свежесформованной пленки (внизу).

В спектрах обнаружены 4 характеристические полосы поглощения, причем полоса (240, 285, 360, 610 нм), причем полоса 360 нм обнаружена нами (в виде плеча) впервые и ранее в литературе не описана. В литературе имеются данные отнесения основных полос в спектрах, претерпевающих изменения в процессе реакции с Gr [106, 112]: уменьшение интенсивности поглощения при 240 нм соответствует уменьшению концентрации гетероцикла Gr, реагирующего с аминогруппой. Полоса 285 нм по литературным данным относится к продукту реакции дженипина с аминогруппой хитозана.

На основании приведенных спектрофотометрических данных, были построены кинетические зависимости оптической плотности для основных полос поглощения (240, 285, 360, 610 нм), представленные на рисунках 49 и 50. На одной координатной плоскости сведены данные по этим полосам для растворов в интервале 0-120 мин и для пленок.

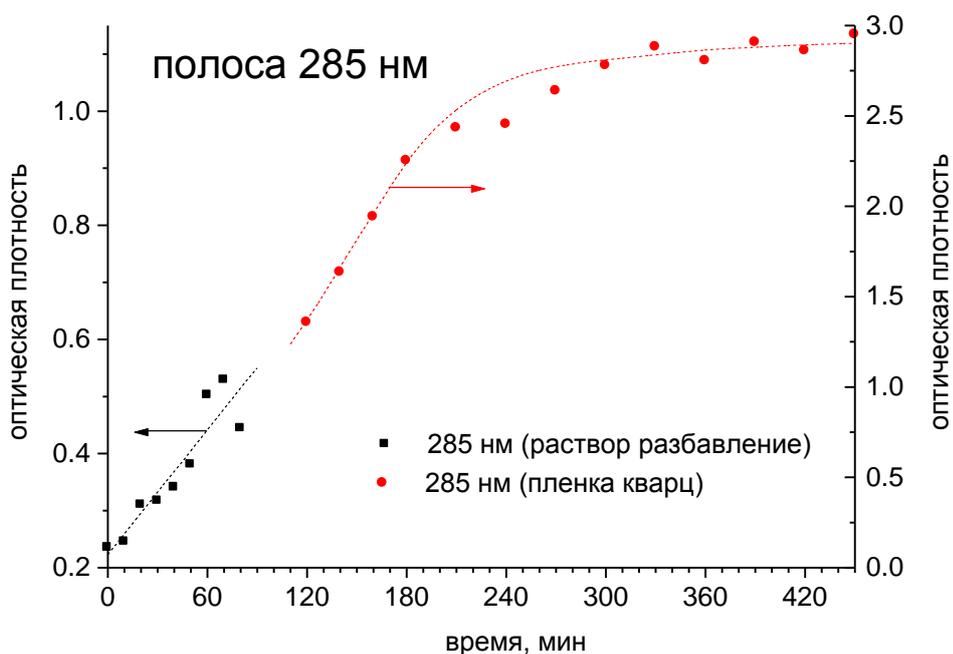


Рисунок 49 – Кинетика изменения интенсивности основных полос поглощения в процессе реакции хитозана с дженипином. Зависимости, приведенные на рис.47-50, получены совместно с н.с. ИСПМ им. Н.С. Ениколопова РАН

Свидченко Е.А.

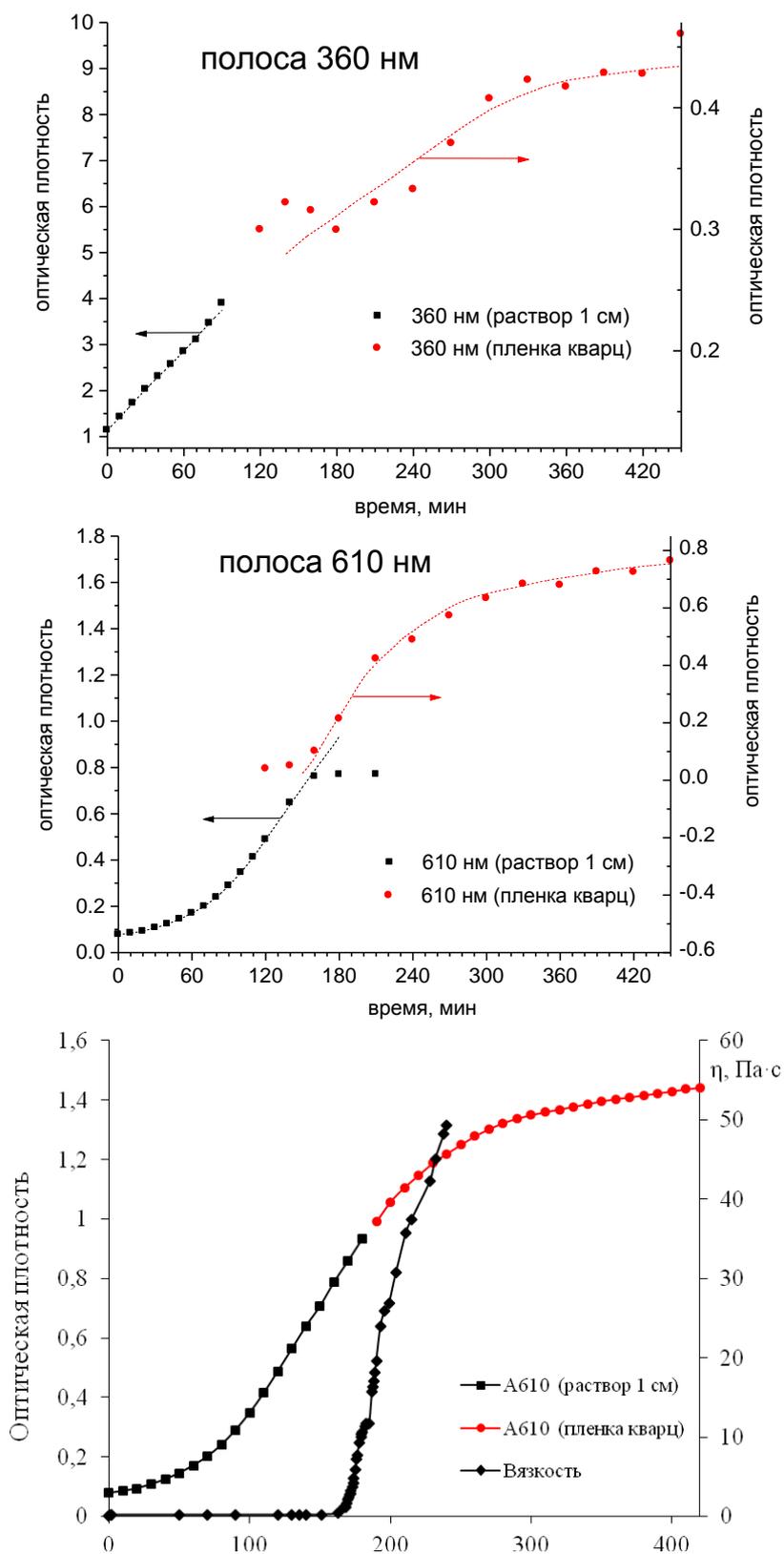


Рисунок 50 – Кинетика изменения интенсивности основных полос поглощения в процессе реакции хитозана с дженипином. На нижнем рисунке кинетические кривые  $A_{610}=f(\text{время})$  приведены в сравнении с кинетикой гелеобразования

$$\eta = f(\text{время})$$

Уменьшение интенсивности полосы 240 нм относящейся к исходному дженипину соответствует уменьшению концентрации гетероцикла Gr, реагирующего с аминогруппой. Интенсивность этой полосы в процессе сшивки падает до 80-ой минуты, затем наблюдаются резкие скачки на фоне возрастания интенсивности полосы. Кроме неравномерности раствора после разбавления в предгелевый период, причиной может быть появление новых полос поглощения в данной области (например, электронного перехода для хромофоров, относящихся к промежуточным продуктам). В пленке на кварце интенсивность данной полосы, по-видимому, не изменяется после гелеобразования, но отмечается некоторый разброс данных.

Полоса 285 нм в разбавленном растворе (по литературным данным, полоса относится к реакции дженипина с аминогруппой хитозана) появляется и почти линейно растет в течение всего периода наблюдения, однако во время предгелевого состояния (90-120 мин) наблюдается разброс данных. Вероятно, он объясняется неравномерностью раствора после разбавления. В пленке на кварце полоса продолжает равномерно расти после гелеобразования.

Из этих данных видно, что поведение полосы 360 нм наиболее близко к поведению полосы 285 нм. По-видимому, эта полоса относится к длинноволновому переходу хромофора, образующегося при внедрении азота аминогруппы хитозана в гетероцикл дженипина. Коэффициенты экстинкции для этих двух переходов отличаются на порядок.

Полоса 610 нм в кювете 1 см, которая по литературным данным относится к олигомерным формам дженипина, имеет S-образный рост на кинетической кривой. Она начинает появляться на спектре поглощения после 60 минут, в интервале 90-150 минут растет почти линейно, после чего рост останавливается. Начальный участок (похожий на индукционный период) связан с наработкой необходимого количества продукта внедрения атома азота хитозана в гетероцикл дженипина. Полимеризация дженипина (и соответствующий ей рост оптической плотности) прекращается после выработки раство-

ренного кислорода. В тонком образце на кварцевой пластине доступ кислорода не затруднен, и рост данной полосы продолжается после гелеобразования.

Сопоставление поведения всех рассмотренных полос поглощения в растворе показывает следующее. В интервале 0-90 мин интенсивность полос 285 нм и 365 нм непрерывно растет, полосы 240 нм – снижается, а для полосы 610 нм большая часть этого времени приходится на индукционный период. В предгелевый интервал времени (0-120 мин) для образцов разбавленных растворов наблюдается значительный разброс данных, полоса 285 нм четко показывает продолжение роста, для полосы 240 нм тоже имеется тенденция увеличения интенсивности. Наиболее вероятно, что наблюдаемый разброс связан с неоднородностью раствора при разбавлении. Полосы 360 нм и 610 нм в этот период продолжают расти.

Таким образом, обнаружено, что для изменения полосы 610 нм обнаружено наличие индукционного периода, а для полосы поглощения продукта взаимодействия хитозана с дженипином, напротив, характерна высокая начальная скорость. Этот факт свидетельствует, что полимеризация дженипина является вторичной реакцией, и во вторичную реакцию полимеризации дженипина вступают только (или преимущественно) группы дженипина с внедренным в гетероцикл в результате реакции с хитозаном атомом азота.

Сопоставление кинетики гелеобразования и роста интенсивности полосы  $\lambda_{610}$  (рис. 50, нижний график) показывает, что появление синей окраски в реакционной смеси предшествует гелеобразованию в системе и является индикатором этого процесса. Это свидетельствует о том, что реакция сшивки хитозана происходит с участием олигомерных производных дженипина (рис. 51), привитых к макромолекулам хитозана. Этот вывод является результатом установленных особенностей механизма реакции взаимодействия хитозана с Gr, приводящей к гелеобразованию в растворе и получению на основе

хитозана не растворимых в воде во всем диапазоне pH полимерных материалов.

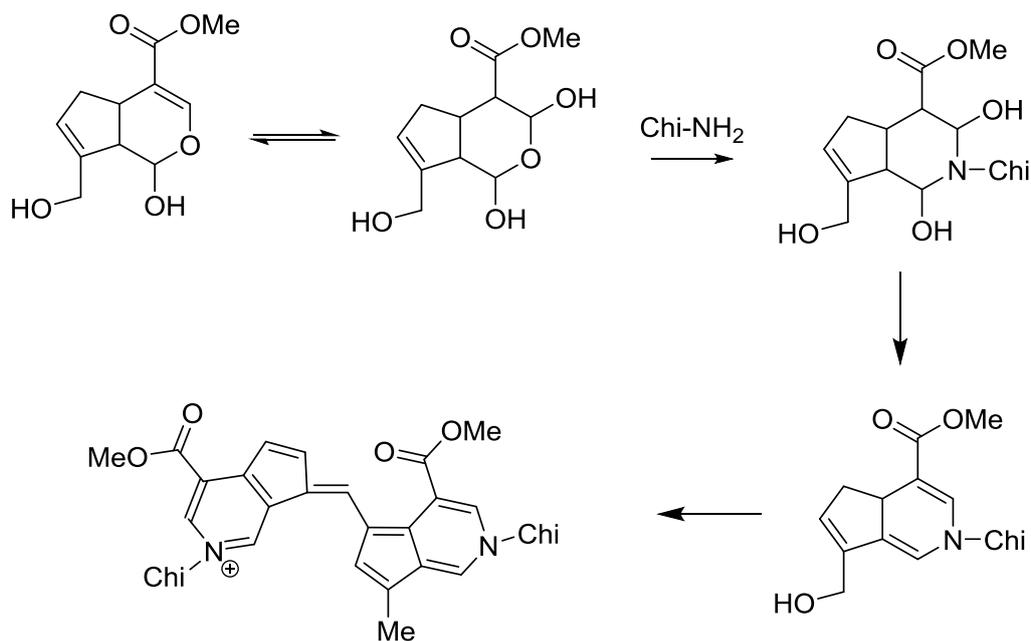


Рисунок 51 – Схема, иллюстрирующая механизм реакции взаимодействия хитозана с Gr.

### 3.2.2 Определение степени сшивки хитозана при получении гидрогелей из растворов, содержащих сшивающие реагенты

Как было показано в предыдущих главах, гелеобразование в растворах хитозана происходит в течение разного времени. Время гелеобразования зависит от природы бифункционального реагента, молекулярной массы хитозана, концентрации и pH его раствора. При этом гелеобразование в одинаковых растворах происходит при разном соотношении сшивающий реагент - аминогруппа хитозана (диальдегид/ $\text{NH}_2$ , Gr/ $\text{NH}_2$ , ГА/ $\text{NH}_2$  и т.п.) (рисунок 52). Несмотря на значительное число работ, посвященных изучению ковалентной сшивки хитозана, не было попытки определения необходимого для гелеобразования числа сшивок.

Кинетические исследования, выполненные с использованием различных сшивающих реагентов: ГА, диальдегидных производных нуклеотидов и нуклеозидов [133], позволили определить минимальную концентрацию сши-

вающего реагента, которая приводит к гелеобразованию в растворе. Были определены времена гелеобразования раствора хитозана (ММ 190000, степень дезацетилирования 87%) с использованием различных концентраций сшивающих реагентов, представленных на рисунке 52. Разительное отличие в скорости сшивки ГА и oUrd может быть отнесено к различной концентрации свободных альдегидов и, следовательно, скорости образования основания Шиффа [138].

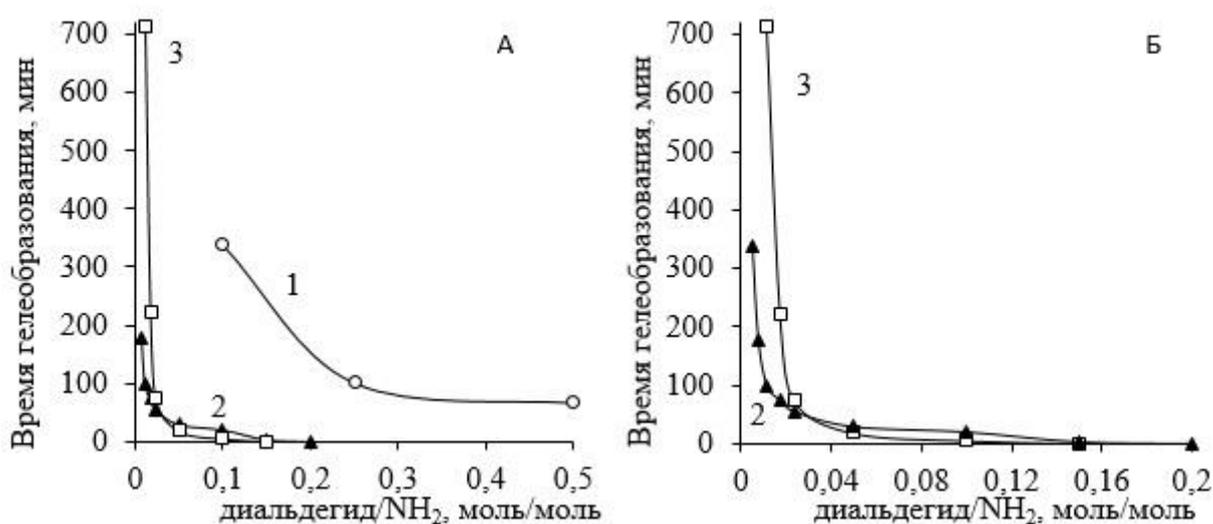


Рисунок 52 – Влияние соотношения диальдегид/ $\text{NH}_2$ -группа на время гелеобразования в 2%-ном растворе хитозана с ММ 190 кДа (20 °С, pH 5.6) в присутствии 1 – oUrd; 2. – oAMP; 3 – ГА.

Из полученных данных можно определить концентрацию диальдегидного сшивающего его реагента, необходимую для гелеобразования хитозана. В молекуле хитозана (190000 г/моль) около 1000 остатков глюкозамина. Минимальное соотношение, вызывающее гелеобразование в растворе хитозана: 5 ммоль oAMP /моль  $\text{NH}_2$  для oAMP (гель образуется в течение 6 часов) или 5 молекул oAMP на 1 молекулу хитозана и 12 ммоль GA /моль  $\text{NH}_2$  в случае GA (гель образуется в течение 12 часов) или 12 молекул GA на 1 молекулу хитозана. При образовании сшивки участвуют 2 аминогруппы хитозана, поэтому минимальное число сшивок (с учетом 100%-ной конверсии альдегидных групп) равно 10 для oAMP и 24 для GA. При образовании

трехмерной сетки геля каждая молекула хитозана должна быть связана с другими макромолекулами не менее, чем 10-ю сшивками oAMP или 24-мя межмолекулярными мостиками ГА. Эти расчеты сделаны в предположении полного использования сшивающего реагента для образования межмолекулярных сшивок.

Чтобы учесть возможность внутримолекулярной сшивки был проведен компьютерный анализ возможного продукта конденсации ГА с хитозаном (рисунок 53). Расчет показал наличие значительных стерических ограничений при образовании дополнительного цикла (внутримолекулярной сшивки), при этом наблюдается деформация гексозных остатков, а также изменение конформации цепи полимера (рисунок 53Б).

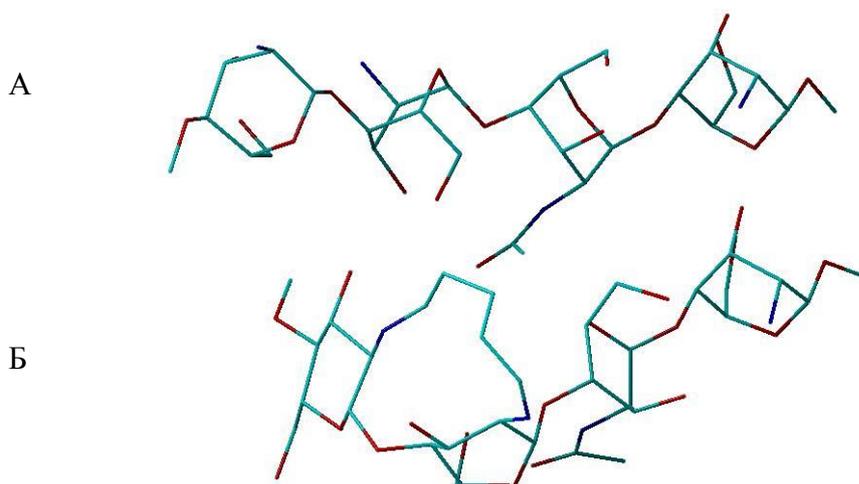


Рисунок 53 – Конформационный анализ макромолекул хитозана (А) и продукта его внутримолекулярной сшивки ГА (Б).

Таким образом, нами впервые проведена оценка числа сшивок, необходимых для гелеобразования, и показано, отсутствие влияния на этот процесс внутримолекулярной сшивки.

Помимо теоретических расчетов была проведена оценка степени сшивки хитозана с использованием экспериментальных данных по набуханию пленок из хитозана, сшитого Gr, и изотерм сорбции паров воды.

На рисунке 54 приведены изотермы сорбции и кинетические кривые набухания пленок, полученных из 2% растворов хитозана с разным содержанием сшивающего реагента: 0,003 и 0,02 моль/моль.

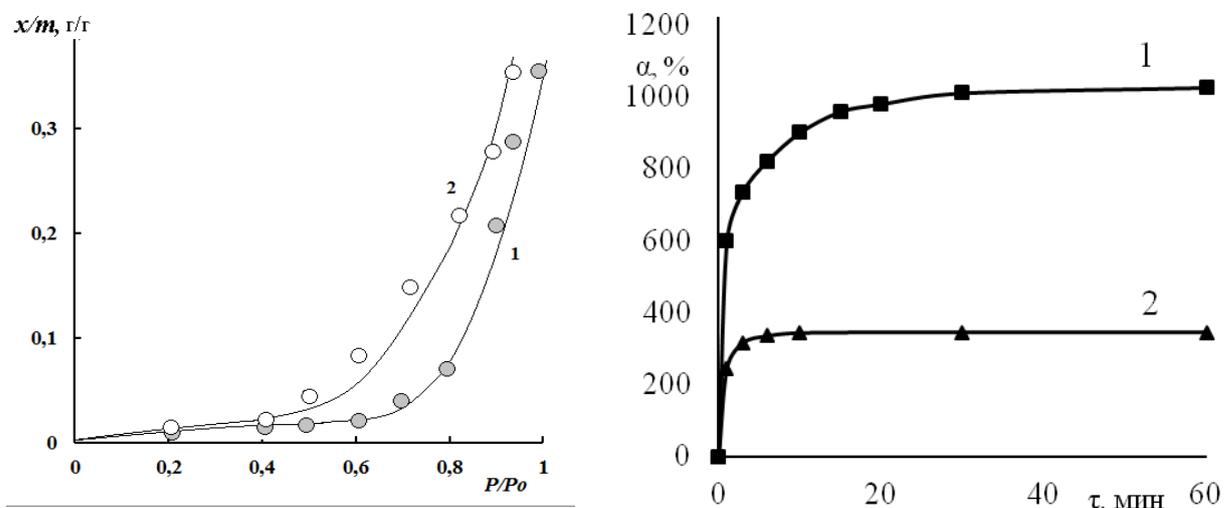


Рисунок 54 – Изотермы сорбции паров воды и кинетика набухания в воде пленок из хитозана, сшитых дженипином. 1- соотношение  $\text{Gr}/\text{NH}_2$  0,003 моль/моль; 2 - 0,02 моль/моль.

Следуя модели двойной сорбции и в соответствии с методикой, предложенной в [140], проведено разложение изотерм сорбции в пакете программы TWOFL на Лэнгмюровскую и Флори-Хаггинса составляющие (рисунок 55). Видно, что заполнение молекулами воды доступных функциональных групп хитозана реализуется в области низкой активности пара, тогда как в области высокой влажности основную долю составляют молекулы свободной, подвижной воды.

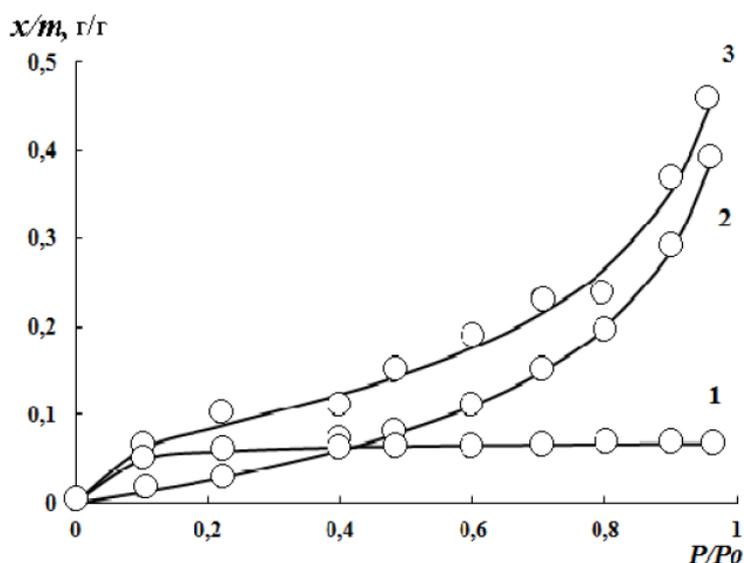


Рисунок 55 – Разложение изотермы сорбции (3) паров воды хитозан – дженипин в рамках модели Флори-Хаггинса: 1 – изотерма Лэнгмюра, 2 – изотерма Флори-Хаггинса.

Используя значения равновесной степени набухания (рисунок 54) и парного параметра взаимодействия  $\chi$ , полученного из изотерм сорбции [141], по уравнению Флори-Ренера [142]:

$$\ln(1 - \varphi_2) + \varphi_2 + \chi_1 \varphi_2^2 + \frac{d_2 \bar{V}_1}{M_c} \left( \varphi_2^{1/3} - \frac{2\varphi_2}{f} \right) = 0,$$

где  $\varphi_2$  – объемная доля полимера в набухшем образце;  $d_2$  – плотность полимера;  $\bar{V}_1$  – парциальный мольный объем растворителя;  $M_c$  – молекулярный вес отрезка цепи между узлами сетки;  $\chi_1$  – константа Хаггинса;  $f$  – функциональность сетки,

были рассчитаны величины молекулярной массы сетки между узлами зацеплений  $M_c$ . Полученные результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6. Результаты расчета степени сшивки хитозана дженипином.

№ образца	Соотношение Gr/NH <sub>2</sub> , моль/моль	Парный параметр взаимодействия $\chi^*$	Равновесная степень набухания	Молекулярная масса цепей хитозана между узлами зацеплений M <sub>c</sub> , г/моль	Число элементарных звеньев хитозана между узлами зацеплений n <sub>c</sub>	Число зацеплений на 100 элементарных звеньев хитозана
1	0,003	0,85	1025	6934	42	2,7
2	0,02	0,99	340	1015	6	18,8

\*Значения парного параметра взаимодействия были получены в Институте физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН

Как видно из таблицы 6, изменение степени модификации аминогрупп происходит пропорционально изменению содержания сшивающего реагента в реакционной смеси, и, следовательно, может использоваться для оценки влияния параметров сшивки на ее эффективность. Однако абсолютные значения числа зацеплений 2,7 и 18,8 (таблица 6) превышают максимально возможную степень сшивки макромолекул хитозана, которая в расчете на 100 элементарных звеньев составляет 0,6 и 4 для пленок, полученных при использовании разных соотношений Gr/NH<sub>2</sub>. Это однозначно свидетельствует о том, что основной вклад в образование сетки зацеплений вносит сближение молекул в результате испарения растворителя. Химическая сшивка лишь фиксирует структуру пленки. Если взаимодействие, приводящее к химическому сшиванию макромолекул, произойдет до равновесной укладки макромолекулярных цепей, то фиксируется неравновесная структура полимера. Если же сшивка завершается при следовом содержании растворителя, когда сетка зацеплений, в основном, уже сформирована, то фиксируется более совершенная равновесная структура пленки и от такого материала можно ожидать более высокого уровня физико-механических свойств. Обнаруженный факт имеет значение для технологии получения полимерных материалов из

растворов с использованием сшивающих реагентов, так дает инструмент для программирования свойств волокон или пленок.

### **3.2.3 Получение пленок на основе хитозана, сшитого дженипином, и исследование их свойств**

Как было показано ранее, в результате сшивки дженипином из раствора хитозана формируется не растворимый в воде гидрогель, окрашенный в синий цвет. Полученный гидрогель обладает упругими свойствами при сжатии, однако он крошится, и кроме того, его влагосодержание близко к равновесному, поэтому абсорбционные свойства материала по отношению к биологическим жидкостям не могут быть высокими. В настоящей главе исследована возможность получения гидрогелевых материалов на основе системы раствор хитозана – дженипин, которые могут использоваться в биомедицинских технологиях.

Учитывая, что в процессе испарения растворителя концентрация раствора возрастает, а с ростом концентрации раствора скорость реакции сшивки увеличивается (кривые 1, 3 рисунок 42), для завершения реакции сшивки при получении пленок должно быть достаточно меньшего количества сшивающего реагента, чем для гелеобразования в 2%-ном растворе хитозана. Поэтому для получения не растворимых в воде пленок, сшитых Gr, кроме соотношения  $Gr/NH_2$  0,02 было использовано минимальное соотношение  $Gr/NH_2$ , обеспечивающее сшивку хитозана в растворе - 0,003 моль/моль, а также в ряде опытов использовалось соотношение 0,0025, использование которого не приводило к гелеобразованию в растворе. В процессе испарения растворителя пленки приобрели голубую окраску, интенсивность которой увеличивается с увеличением содержания дженипина (рисунок 56). Пленка, полученная при соотношении 0,0025, после испарения растворителя в течение 2-х дней оставалась бесцветной, однако впоследствии также становилась голубой.

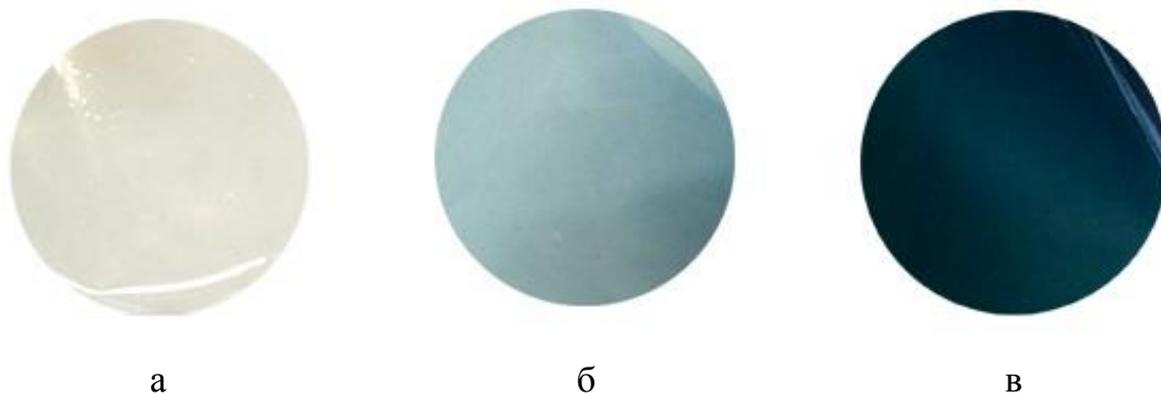


Рисунок 56 – Фотографии пленок на основе хитозана, сшитого Gr. Немодифицированная пленка из хитозана (а); пленки из хитозана, сшитые при соотношении Gr/NH<sub>2</sub> 0,003 (б) и 0,02 (в) моль/моль.

Характер кинетических кривых набухания в воде пленок из хитозана, сшитого Gr (рисунок 57, показывает, что пленки не растворяются в воде, а степень их набухания (1800% для пленки на основе хитозана с ММ 320 кДа) уменьшается при увеличении концентрации сшивающего реагента и молекулярной массы полимера. Изменение геометрических размеров пленки в процессе ее набухания в воде приведено на рисунке 58.

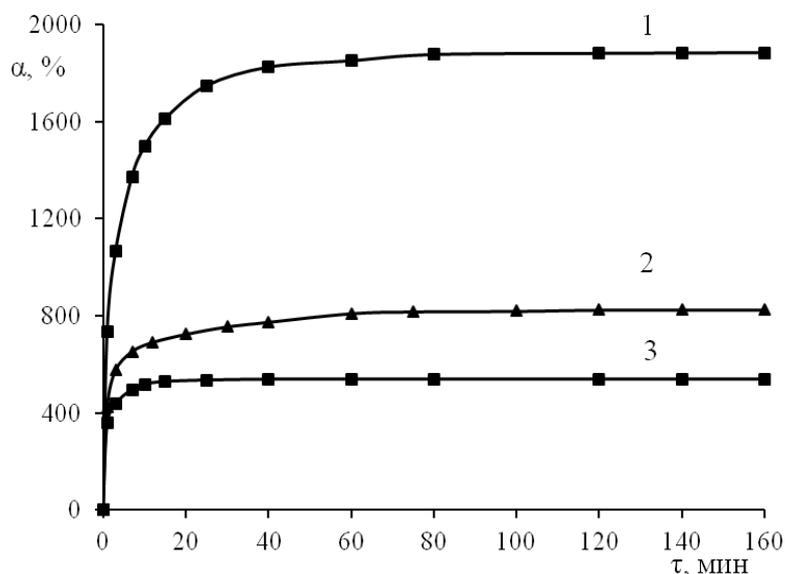


Рисунок 57 – Кинетика набухания пленок из хитозана с ММ 320 кДа (■) и 190 кДа (▲), сшитых Gr при соотношении Gr/NH<sub>2</sub> 0,003 моль/моль (1), и 0,02 моль/моль (2, 3). Концентрация раствора хитозана 2%, pH 3,8.

Размеры пленки

исходные 3,0x3,0 см Толщина 80 мкм	после набухания 3,9x3,9 см Толщина 330 мкм
--	--

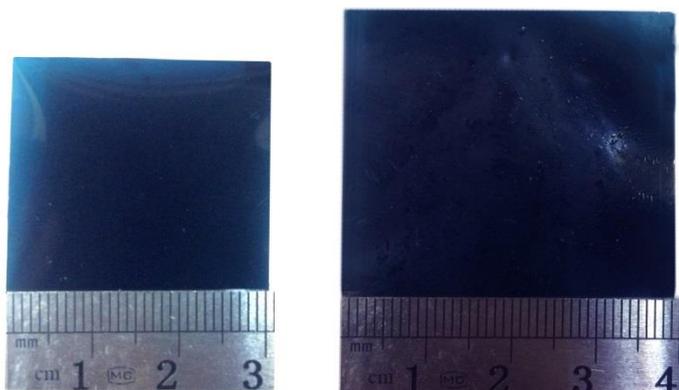


Рисунок 58– Изменение геометрических размеров пленки, полученной из 2% раствора хитозана с ММ 320 и соотношении  $Gp/NH_2$  0,02 моль/моль в процессе ее набухания в воде.

На рисунке 59 приведены электронные спектры поглощения пленок на основе хитозана, сшитого дженипином, при выбранных соотношениях  $Gp/NH_2$ .

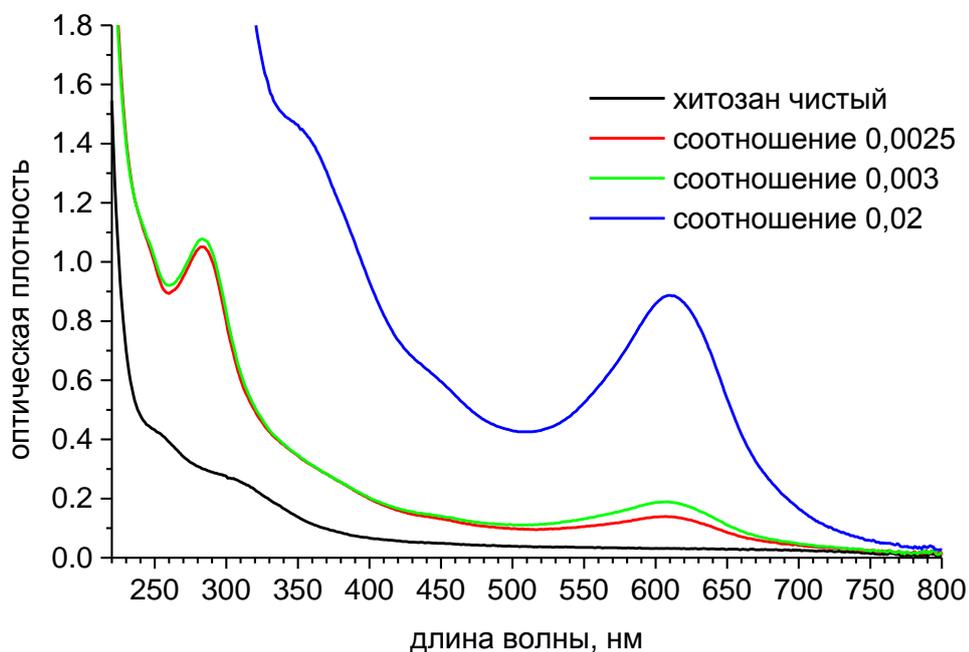


Рисунок 59 – Спектры поглощения пленок толщиной 50 мкм, полученных при различном соотношении  $Gp/NH_2$ .

В приведенных спектрах присутствуют те же основные полосы, что и при шшивке в растворе: 605-610 нм, плечо в районе 360 нм (для всех пленок), полоса с максимумом 280 нм и слабо проявляющаяся для пленок с низким содержанием дженипина полоса с максимумом 240 нм (в пленке с соотношением 0,02 эти полосы выходят за предел измерений прибора). Уменьшение соотношения дженипин - хитозан приводит к уменьшению интенсивности полосы поглощения при 610 нм.

Для сравнения формы полученных полос поглощения между собой, был взят средний спектр поглощения между пленками с соотношением 0,0025 и 0,003 (обозначен как пленка с соотношением 0,00275), затем из полученного спектра поглощения и спектра пленки с соотношением 0,02 был вычтен спектр поглощения пленки хитозана, после чего оба спектра были отнормированы по длинноволновой полосе поглощения (рисунок 60).

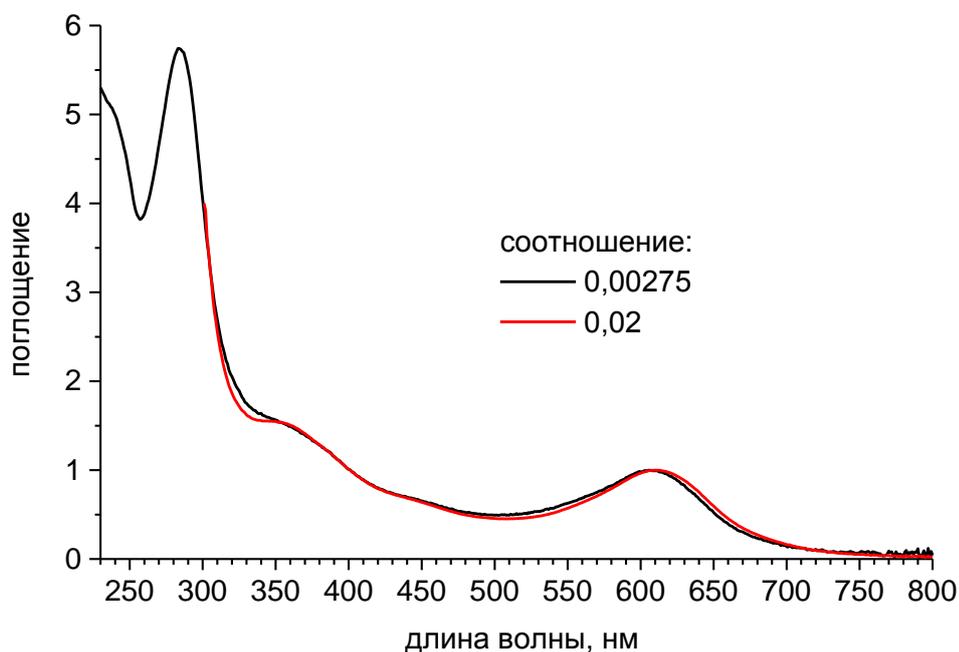


Рисунок 60 – Нормированные спектры поглощения для пленок с соотношением 0,00275 и 0,02

Как видно из рисунка 60, форма спектра поглощения для двух рассматриваемых пленок в диапазоне длин волн 300-800 нм тождественна. Это свидетельствует о тождественном наборе хромофорных групп в обоих образцах и указывает на одинаковую природу химических реакций, протекающих при сшивке с разным соотношением Gr/NH<sub>2</sub>.

Использование высокого соотношения сшивающий реагент - NH<sub>2</sub> приводит к углублению синего окрашивания и помутнению полученных пленок. На рисунке 61 приведена фотография пленки, полученной при соотношении 0,02 моль/моль. На пленке визуализируются частицы новой фазы, которая, вероятно, представляет собой полимерную форму дженипина или привитого сополимера хитозана и дженипина, которая начинает формироваться при высоком содержании сшивающего реагента.

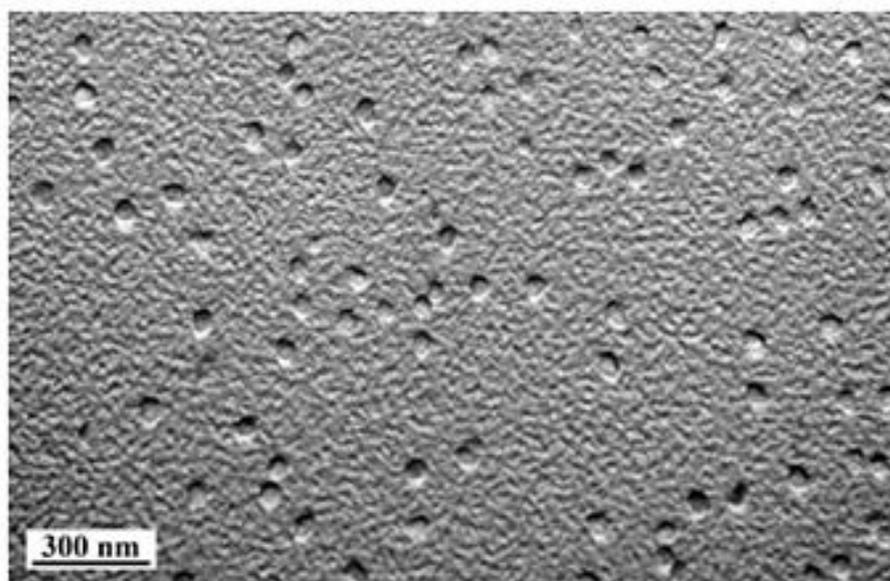


Рисунок 61 – Микрофотография поверхности пленки на основе хитозана, сшитого при соотношении Gr/NH<sub>2</sub> 0,02 моль/моль.

Сшивка бифункциональным реагентом, фиксируя полимерные цепи, не позволяет им принимать равновесные конформации в процессе испарения растворителя [135]. Этот факт подтверждается обнаруженным снижением уровня физико-механических свойств пленок: прочность пленок, полученных с использованием соотношением Gr/NH<sub>2</sub> 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 происходит 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 7).

Таблица 7 – Разрывная нагрузка пленок, полученных из хитозана и хитозана, сшитого дженипином при различных соотношениях сшивающего реагента к аминогруппе полимера

№ пп	Соотношение Gr/NH <sub>2</sub> , 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

Таким образом, выявленные особенности механизма и кинетики взаимодействия хитозана с Gr впервые для системы хитозан - сшивающий реагент позволили реализовать равновесные условия формирования структуры хитозана в процессе испарения растворителя, что привело к резкому увеличению прочности хитозановых пленок.

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

### **3.2.4 Получение биополимерных матриц на основе хитозана, сшитого Gp или GA и исследование их свойств**

Высокая влагоудерживающая способность гидрогелевых пленок, полученных из биополимера хитозана, сшитого бифункциональным реагентом природного происхождения дженипином, и возможность ее регулирования за счет изменения условий сшивки создает перспективы для создания на их основе биodeградируемых гидрогелевых матриц для тканевой инженерии и систем контролируемого выделения и доставки лекарственных соединений.

Неотъемлемой частью тканевой инженерии является разработка оптимального биodeградируемого полимерного каркаса – скаффолда (матрикса), обеспечивающего адгезию и пролиферацию клеток, который должен постепенно замещаться формирующимися тканями или органами [143,144]. После выполнения функции временного каркаса, поддерживающего рост и пролиферацию клеток, а также формирование на их основе новых тканей, матрикс должен резорбироваться в организме. Высокая пористость и необходимый размер пор в скаффолдах являются ключевым условием для обеспечения заселения клеток и их пролиферации [77, 145]. Пористая структура с сообщающимися порами способствует метаболическому и газовому обмену во вновь образующихся тканях, а большая площадь поверхности и определенный размер пор способствуют прорастанию тканей. Таким образом, основные требования, которые предъявляются к полимерным скаффолдам – это биосовместимость, морфологическая структура, характеризующаяся наличием крупных пор, поддерживающая миграцию, хорошую адгезию и последующую жизнедеятельность клеток и комплекс необходимых механических и физико-химических свойств, таких как атравматичность, адгезионные характеристики, упругость, способность к набуханию в воде [146]. Всем этим требованиям будут отвечать гидрогели на основе хитозана, пористую структуру которых можно зафиксировать путем замораживания и последующей лиофильной сушки. При этом характеристики исходной системы определяют

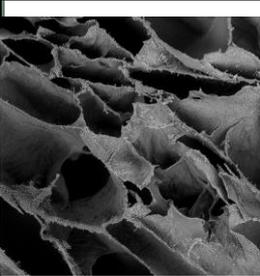
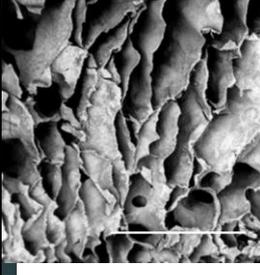
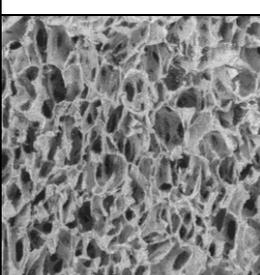
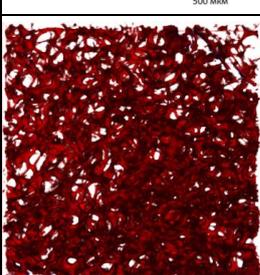
структуру полученного матрикса (характер и распределение пор по размерам), а также степень адгезии и расплывания клеток, которые, в свою очередь, определяют их последующий рост и пролиферацию.

В настоящей главе изучены условия получения полимерных матриксов на основе хитозана с низким содержанием сшивающего реагента дженипина и глутарового альдегида, а также проведено сравнительное исследование цитотоксичности полученных материалов и особенностей роста в них животных клеток.

Условия получения скаффолдов выбирали на основании проведенных исследований процесса гелеобразования хитозана в присутствии сшивающего реагента дженипина или ГА. Как уже отмечалось выше, эффект от увеличения рН до 6,4 (степень протонирования 43%) оказался не столь значительным, так как для потери системой способности к течению в результате сшивки достаточно 1% от общего числа аминогрупп [138]. В связи с этим для получения матриксов использовали растворы хитозана с рН 5,6, обеспечивающим содержание реакционно-способных депротонированных аминогрупп 18%. Как было показано выше, после завершения гелеобразования происходит увеличение модуля сдвига во времени, что свидетельствует о протекании реакции сшивки в уже сформированных гидрогелях, поэтому для получения пористых биополимерных матриксов гидрогели перед замораживанием необходимо выдерживать в течение суток.

Пористые матриксы были получены путем замораживания и лиофилизации гидрогелей хитозана. Внешний вид и структура биополимерных матриксов, полученных лиофильной сушкой образцов гидрогелей хитозана, приведены в таблице 8 (отрезок масштабной линейки соответствует 500 мкм). Все образцы имели систему взаимопроникающих пор. Взаимосвязанная пористая структура 3D-матрикса является необходимым условием пролиферации клеток внутри материала и снабжения их питательными веществами [114].

Таблица 8 – Биополимерные матрицы на основе хитозана, сшитого ГА и Гр.

№	ММ хитозана/концентрация раствора/СР	Структура биополимерных матриц		
		Фотография поверхности	Электронная микроскопия	Конфокальная лазерная микроскопия
1	320 кДа /2,0 % / Гр			
2	190 кДа /3,2 % / Гр			
3	320 кДа /2,0 %/ГА			

Варьирование состава гелеобразующей системы раствор хитозана – сшивающий реагент позволило получить матрицы, различающиеся по структуре (морфология, степень анизотропии, средний размер пор) и, как результат, по распределению (локализации) в них клеток. Наиболее крупными порами (свыше 500 мкм) обладал матрикс, полученный на основе гидрогеля из хитозана с ММ 320 кДа, сшитого дженипином (образец 1). Замена сшивающего реагента на более реакционно-способный ГА или повышение концентрации хитозана приводило к получению более плотной структуры, в кото-

рой при замораживании формировались мелкие кристаллы льда, а после лиофильного высушивания – поры размером 100-200 мкм (образец 2) или 30-100 мкм (образец 3).

Все образцы имели высокую влагоудерживающую способность, причем максимальное равновесное влагосодержание демонстрировали матриксы с более мелкими порами (рисунок 62). Причиной различной влагоудерживающей способности может быть как разная способность к набуханию хитозана с ММ 320 и 190 кДа, так и осмотические свойства самого материала, поэтому из полимерных растворов, состав которых аналогичен составу соответствующих образцов гидрогелей, методом полива на чашки Петри с последующим испарением растворителя при комнатной температуре были получены пленки толщиной 100 мкм и определена их равновесная степень набухания.

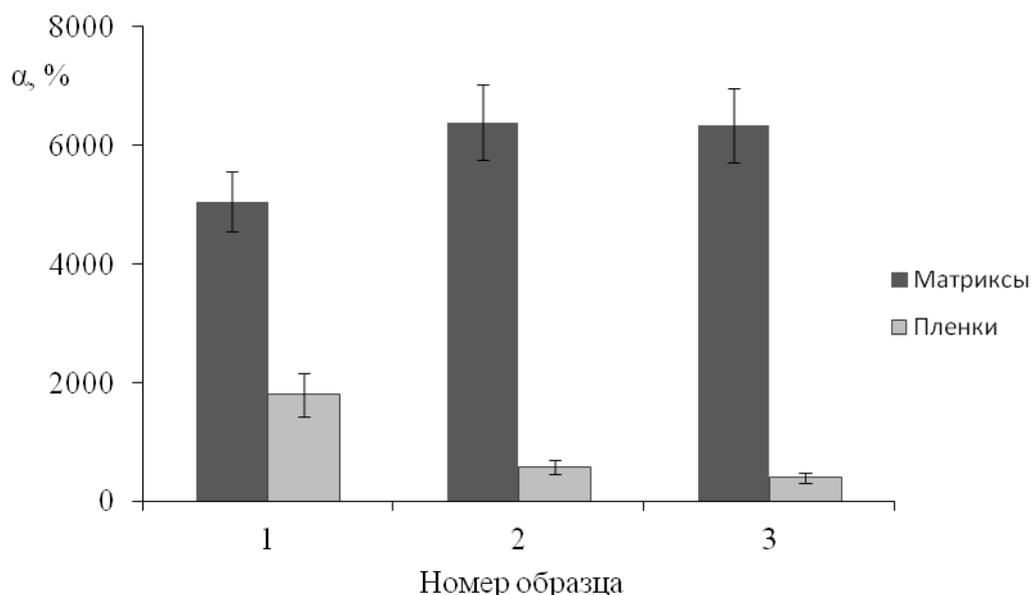


Рисунок 62 – Влагопоглощение и степень набухания ( $\alpha$ ) биополимерных матриксов и пленок, полученных на основе гидрогелей хитозана, модифицированного сшивкой дженипином и глутаровым альдегидом. Состав образцов матриксов и пленок одинаков и приведен в таблице 7.

*Исследование гидрогелей на основе хитозана в модели in vitro с использованием клеточной культуры фибробластов.*

Ранее [12] было показано, что при фиксации биологических тканей цитотоксичность дженипина была в 5000-10000 раз ниже, чем glutaraldehyde. Возможность использования сшивающего реагента для получения биополимерного матрикса для тканевой инженерии определяется токсичностью не самого реагента, а продукта его взаимодействия с хитозаном. Как уже отмечалось, в целом ряде работ не было выявлено никакого негативного влияния ГА, который использовали в качестве сшивающего агента при получении матриксов, на жизнеспособность клеток и их рост. Однако в работе [147], где хитозан и дженипин использовали для получения сшитых хитозановых микрочастиц, было показано, что при имплантации этих микрочастиц внутримышечно мышам в случае ГА наблюдали воспалительную реакцию. Лучшая биосовместимость хитозановых мембран, сшитых дженипином, по сравнению с пленками, сшитыми ГА, была продемонстрирована и на человеческих эпителиальных RPE (retinal pigment epithelial) клетках [11].

Причиной обнаруженной токсичности может быть высокая степень сшивки исследованных образцов, в которых замещенными оказались 30 и 70% аминогрупп хитозана [11, 147], что в случае ГА соответствует 15-30 % масс. присоединенного реагента. Как было нами показано (Таблица 8), для получения не растворимого в воде биополимерного матрикса на основе гидрогеля хитозана достаточно 0,005-0,01 моль сшивающего реагента на 1 моль аминогрупп хитозана (0,5-1%).

Цитотоксичность скаффолдов на основе гидрогелей хитозана изучали методом тестирования экстрактов, а линию мышечных фибробластов L929 использовали в качестве модельной. Идея «экстракт–теста» заключается в замене среды для культивирования клеток экстрактами, полученными после инкубации образцов гидрогелей в среде культивирования, и дальнейшем анализе жизнеспособности клеток в этих экстрактах с помощью МТТ-теста че-

рез 24 и 48 ч. Результаты «экстракт–теста» представлены на рисунке 63. Изучение влияния экстрагируемых из скаффолда веществ на жизнеспособность клеток показало отсутствие токсичности экстрактов от всех образцов для клеток (рисунок 64). Кроме того, после 48 час количество жизнеспособных клеток по сравнению с контролем (монослой), было во всех образцах выше, чем после 24 часов. Это можно объяснить, вероятно, адаптацией клеток. В случае образца матрикса, полученного на основе хитозана с ММ 320 кДа, сшитого дженипином (Хит-320/Gr), доля жизнеспособных клеток была несколько выше - 105%, чем в случае образца (Хит-190/Gr) - 100% и образца, сшитого ГА (Хит-320-ГА), - 94% по сравнению с монослоем клеток. Незначительное снижение доли жизнеспособных клеток можно скорее отнести к особенностям получения экстрактов из матриксов с мелко-пористой структурой.

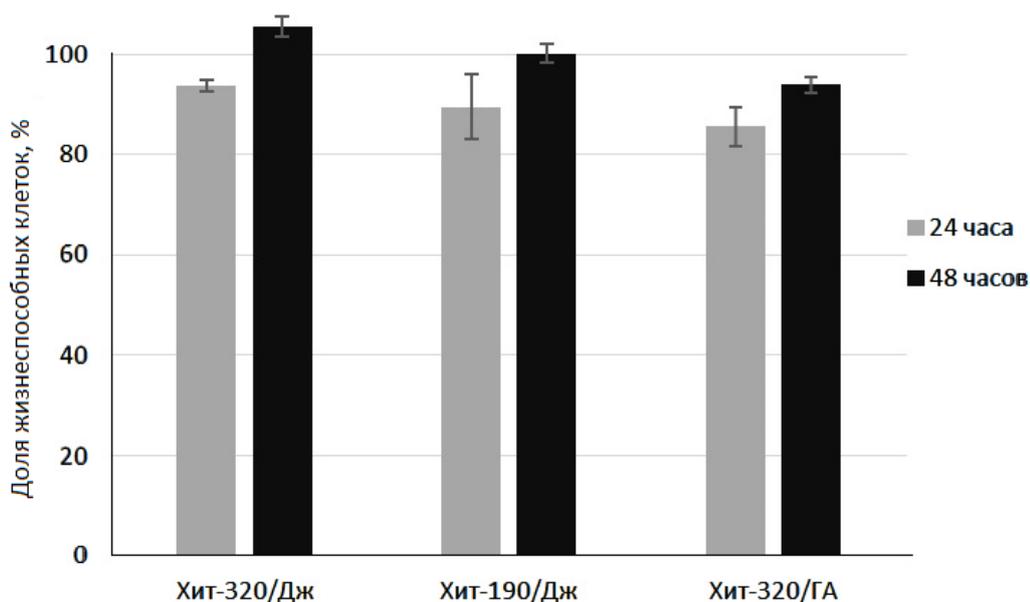


Рисунок 63 – Жизнеспособность клеток L929 после 24 и 48 ч инкубации с экстрактами. Контроль (100%) – монослой клеток, культивируемый в среде без экстрактов. Соответствие обозначений матриксов номерам образцов в таблице 2: Хит-320/Gr - 1, Хит-190/Gr - 2 и Хит-320/ГА – 3.

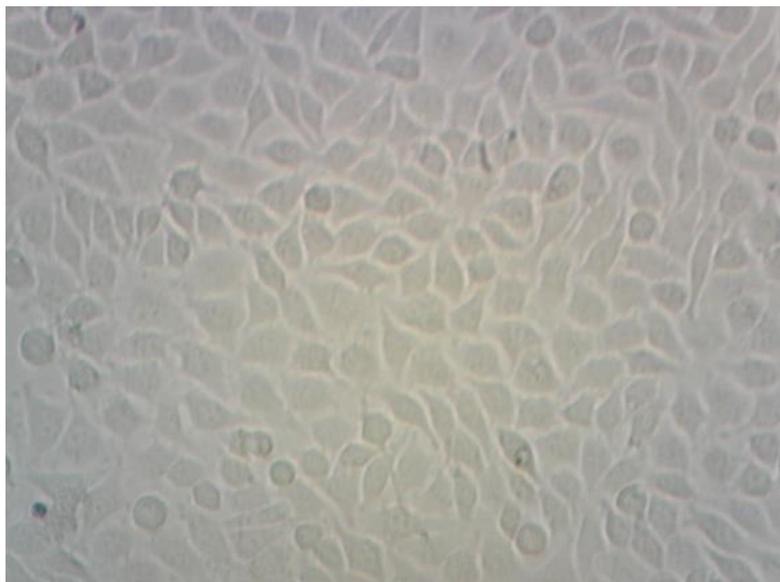
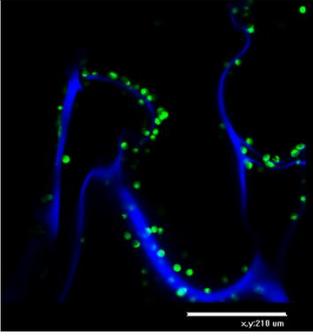
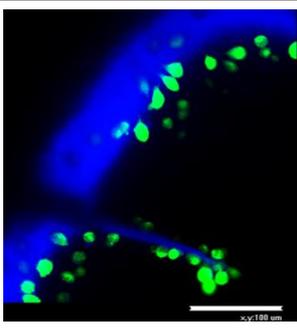
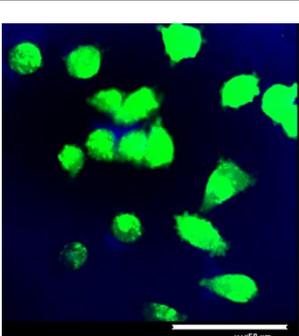
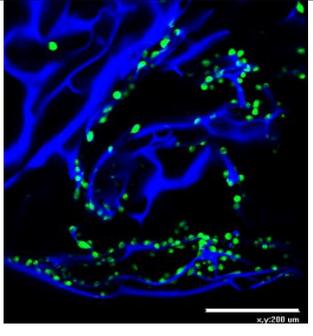
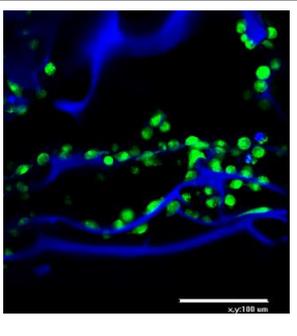
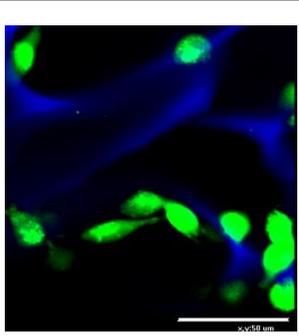
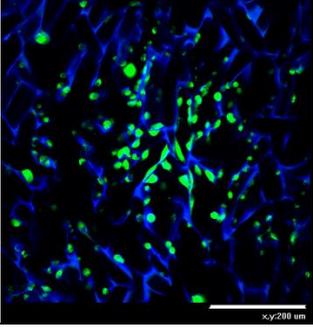
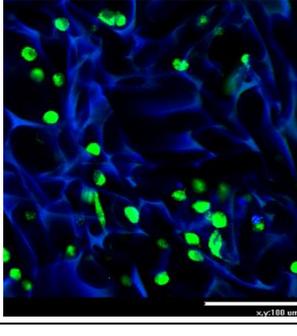
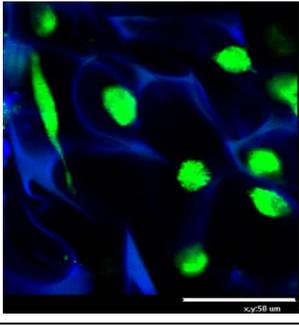


Рисунок 64 – Микрофотография (оптический микроскоп) клеток после 24 ч культивирования в присутствии экстракта, полученного после инкубации образца гидрогеля Хит-320/Gr в среде культивирования. Увеличение в 100 раз.

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 (таблица 9). При этом жизнеспособные клетки были окрашены красителем Calcein AM (зеленый цвет), а гели визуализированы с помощью красителя DAPI (синий цвет). Из таблицы 9 видно, что клетки росли и пролиферировали во всех трех образцах матриксов. Значительных различий в морфологии клеток (степени распластанности) нам обнаружить не удалось.

Таблица 9 – Распределение и морфология клеток мышечных фибробластов линии L929 в гидрогелях на основе хитозана после 4 дней культивирования.

№	Обозначение	Распределение и морфология клеток		
		ЛИНЕЙКА 200 МКМ	ЛИНЕЙКА 100 МКМ	ЛИНЕЙКА 50 МКМ
1	Хит-320/ Gr			
2	Хит-190/ Gr			
3	Хит-320/ ГА			

Таким образом, испытания лиофилизованных гидрогелей хитозана, сшитого Gr, в процессе культивирования животных клеток показали низкую цитотоксичность, быстрый рост и пролиферацию клеток с образованием мультислоев при их использовании в качестве биополимерных матриц.

\*\*\*

Полученные в главе 3.2 результаты изучения механизма взаимодействия хитозана и природного сшивающего реагента дженипина и взаимосвязи состава формовочных композиций, условий реакции сшивки, кинетических закономерностей процесса гелеобразования в растворах хитозана в присутствии дженипина и свойств пленок и пористых биополимерных матриц на основе хитозана позволили определить условия получения материалов, обеспечивающие высокий уровень функциональных свойств (таблица 10).

Таблица 10 – Параметры получения и свойства пленок и пористых матриц из хитозана, сшитого дженипином.

Полимерный материал	Технологические параметры				Свойства полимерных материалов			
	ММ хитозана, кДа	Концентрация раствора хитозана, %	pH	Gp/NH <sub>2</sub> , моль/моль	Степень набухания, %	Прочность, МПа	Размер пор, мкм	Влагопоглощение, %
Пленка	320	2,0	3,8	0,0025	1200	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

Таким образом, 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 матриц 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 формирования 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 1800%. 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.

## Список литературы

1. Honarkar H., Barikani M. Applications of biopolymers I: chitosan // *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*. – 2009. – Vol. 140. – № 12. – P. 1403-1420.
2. Hennink W. E., Van Nostrum C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels // *Advanced drug delivery reviews*. – 2012. – Vol. 64. – P. 223-236.
3. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications // *Progress in polymer science*. – 2006. – Vol. 31. – № 7. – P. 603-632.
4. Chitosan. Eds: K.G. Skryabin, S.N. Mikhailov, V.P. Varlamov. M.: Centre "Bioengineering" RAS. – 2013. – 593p.
5. Mello R. S., Bedendo G. C., Nome F., Fiedler H. D., Laranjeira M. C. Preparation of chitosan membranes for filtration and concentration of compounds under high pressure process // *Polymer Bulletin*. – 2006. – Vol. 56. – № 4-5. – P. 447-454.
6. Wang X., Yan Y., Xiong, Z. Lin, F. Wu, R. Zhang, R. Lu Q. Preparation and evaluation of ammonia-treated collagen/chitosan matrices for liver tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomat.* – 2005. – Vol. 75. – № 1. – P. 91-98.
7. Hoffmann B., Seitz D., Kokott A., Mencke A., Ziegler G. Glutaraldehyde and oxidised dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffolds for cartilage tissue engineering // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2009. – Vol. 20. – № 7. – P. 1495-1503.
8. Кильдеева Н.Р., Михайлов С.Н. Гидрогели хитозана, модифицированного бифункциональными сшивающими реагентами // «Хитозан» / edited by К.Г. Скрыбина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. – Moscow: The Centre "Bioengineering" RAS, 2013. – P. 271-307.
9. Leung H. W. Ecotoxicology of glutaraldehyde: review of environmental fate and effects studies // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2001. – Vol. 49. – № 1. – P. 26-39.

10. Kildeeva N.R., Perminov P.A., Vladimirov L.V., Novikov V.V., Mikhailov S.N. About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2009. – Vol.35. – № 3. – P.360-369.
11. Lai J. Y., Wang T. P., Li Y. T. In vitro response of retinal pigment epithelial cells exposed to chitosan materials prepared with different cross-linkers // *International journal of molecular sciences*. – 2010. – Vol. 11. – № 12. – P. 5256-5272.
12. Tsai C. C. Huang R. N., Sung H. W., Liang H. C. In vitro evaluation of the genotoxicity of a naturally occurring crosslinking agent (genipin) for biologic tissue fixation // *Journal of biomedical materials research*. – 2000. – Vol. 52. – № 1. – P. 58-65.
13. Liu Z., Jiao, Y., Wang Y., Zhou C., Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems // *Advanced drug delivery reviews*. – 2008. – Vol. 60. – № 15. – P. 1650-1662.
14. Sarwar A., Katas H., Zin N. M. Antibacterial effects of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: impact of particle size molecular weight // *Journal of nanoparticle research*. – 2014. – Vol. 16. – № 7. – P. 1-14.
15. Il'ina A.V., Varlamov V.P., Ermakov Yu. A., Orlov V.N., Skryabin G. Chitosan is a natural polymer for constructing nanoparticles // *Doklady Chemistry*. – 2008. – Vol. 421. – № 1. – P. 165-167.
16. Shu X. Z., Zhu K. J. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2002. – Vol. 54. – № 2. – P. 235-243.
17. Касаткина М.А., Буданцева Н.А., Кильдеева Н.Р. Получение биологически активных пленочных материалов на основе хитозана, модифицированных полифосфатами // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2016. – Т.50. – № 4. – С.32-39.
18. Anitha A. Rejinold N. S., Bumgardner J. D., Nair S. V., Jayakumar R. Approaches for functional modification or cross-linking of chitosan // *Chitosan-*

based systems for biopharmaceuticals. First edition. Edited by Bruno Sarmento and Jose das Neves, John Wiley&Sons, Ltd. Published– 2012.

19. Tiwary A. K., Rana V. Cross-linked chitosan films: effect of cross-linking density on swelling parameters // *Pak J Pharm Sci.* – 2010. – Vol. 23. – № 4. – P. 443-448.

20. Varshosaz J., Karimzadeh S. Development of cross-linked chitosan films for oral mucosal delivery of lidocaine // *Research in Pharmaceutical Sciences.* – 2008. – Vol. 2. – № 1. – P. 43-52.

21. Mi F. L., Shyu S. S., Wong T. B., Jang S. F., Lee S. T., Lu K. T. Chitosan–polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymers complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent // *Journal of applied polymer science.* – 1999. – Vol. 74. – № 5. – P. 1093-1107.

22. Mi F. L., Sung H. W., Shyu S. S., Su C. C., Peng C. K. . Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads // *Polymer.* – 2003. – Vol. 44. – № 21. – P. 6521-6530.

23. Rijal M. A. S., Mikail A., Sari R. Pengaruh pH larutan tripolifosfat terhadap karakteristik fisik serta profil pelepasan mikropartikel teofilin-chitosan // *Majalah Farmasi Airlangga.* – 2010. – Vol. 8. – № 2. – P. 28-33

24. Wu Y., Yang W., Wang C., Hu J., Fu S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate // *International journal of pharmaceuticals.* – 2005. – Vol. 295. – № 1. – P. 235-245.

25. Hasanovic A., Zehl M., Reznicek G., Valenta, C. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as a possible skin drug delivery system for aciclovir with enhanced stability // *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* – 2009. – Vol. 61. – № 12. – P. 1609-1616.

26. Nripendra S., Upasani C. D. Skin Permeation of Zidovudine from Crosslinked Chitosan Film Containing Terpene Enhancers for Transdermal Use // *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* – 2013. – Vol. 7. – № 2. – P. 75-85.

27. Cai Y., Lapitsky Y. Formation and dissolution of chitosan/pyrophosphate nanoparticles: is the ionic crosslinking of chitosan reversible? // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2014. – Vol. 115. – P. 100-108.
28. Chen S., Liu M., Jin S., Wang B. Preparation of ionic-crosslinked chitosan-based gel beads and effect of reaction conditions on drug release behaviors // *International journal of pharmaceutics*. – 2008. – Vol. 349. – №. 1. – P. 180-187.
29. Shu X. Z., Zhu K. J., Song W. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release // *International journal of pharmaceutics*. – 2001. – Vol. 212. – №. 1. – P. 19-28.
30. Rana V., Babita K., Goyal D., Tiwary A. Sodium citrate cross-linked chitosan films: optimization as substitute for human/rat/rabbit epidermal sheets // *J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2005. – Vol. 8. – P. 10-17.
31. Boonsongrit Y., Mueller B. W., Mitrevej A. Characterization of drug–chitosan interaction by  $^1\text{H}$  NMR, FTIR and isothermal titration calorimetry // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2008. – Vol. 69. – №. 1. – P. 388-395.
32. Cho J., Heuzey M. C., Bégin A., Carreau P. J. Physical gelation of chitosan in the presence of  $\beta$ -glycerophosphate: the effect of temperature // *Biomacromolecules*. – 2005. – Vol. 6. – №. 6. – P. 3267-3275.
33. Gierszewska-Drużyńska M., Ostrowska-Czubenki J., Kwiatkowska A. Effect of ionic crosslinking on density of hydrogel chitosan membranes // *Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. – 2013. – Vol. 18. – №. 18. – P. 49-57.
34. Anitha A., Deepagan V. G., Rani V. D., Menon D., Nair S. V., Jayakumar R. Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles // *Carbohydrate Polymers*. – 2011. – Vol. 84. – №. 3. – P. 1158-1164.
35. Kašpar O., Tokárová V., Nyanhongo G. S., Gübitz G., Štěpánek F. Effect of cross-linking method on the activity of spray-dried chitosan microparticles with

immobilized laccase // *Food and Bioproducts Processing*. – 2013. – Vol. 91. – №. 4. – P. 525-533.

36. Sodium Dextran Sulfate / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: URL: [http://sostav-info.ru/component/eng/s/so/Sodium\\_Dextran\\_Sulfate.html](http://sostav-info.ru/component/eng/s/so/Sodium_Dextran_Sulfate.html). (дата обращения: 17.05.2016).

37. Патент РФ № 2371170 МПК А61К 8/60, А61Р 19/00 Косметологическое и/или дерматологическое средство, стимулирующее микроциркуляцию тканей кожи / Корнеева Р.В., Кореева Е.А., Казанский А.Л. Опубликовано 27.10.2009. Бюл. №30.5

38. Lin Y. H., Mi F. L., Chen C. T., Chang W. C., Peng S. F., Liang H. F., Sung J. Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery // *Biomacromolecules*. – 2007. – Vol. 8. – №. 1. – P. 146-152.

39. Philipp B., Dautzenberg H., Linow K. J., Kötz J., Dawydoff W. Polyelectrolyte complexes—recent developments and open problems // *Progress in polymer science*. – 1989. – Vol. 14. – № 1. – P.91-172.

40. Hamman J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems // *Marine drugs*. – 2010. – Vol. 8. – № 4. – P. 1305-1322.

41. Chavasit V., Kienzle-Sterzer C., Torres J. A. Formation and characterization of an insoluble polyelectrolyte complex: chitosan-polyacrylic acid // *Polymer Bulletin*. – 1988. – Vol. 19. – № 3. – P. 223-230.

42. Sæther H. V., Holme H. K., Maurstad G., Smidsrød O., Stokke B. T. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan // *Carbohydrate Polymers*. – 2008. – Vol. 74. – № 4. – P. 813-821.

43. Ramasamy T., Tran T. H., Cho H. J., Kim J. H., Kim Y. I., Jeon J. Y., Kim J.O. Chitosan-based polyelectrolyte complexes as potential nanoparticulate carriers: physicochemical and biological characterization // *Pharmaceutical research*. – 2014. – Vol. 31. – №5. – P. 1302-1314.

44. Du W.L., Niu S.S., Xu Y.L., Xu Z.R. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions // *Carbohydrate Polymers*. – 2009. – Vol. 75. – №3. – P. 385-389.
45. Abdel-Hafez S. M., Hathout R. M., Sammour O. A. Towards better modeling of chitosan nanoparticles production: Screening different factors and comparing two experimental designs // *International journal of biological macromolecules*. – 2014. – Vol. 64. – P. 334-340.
46. Antoniou J., Liu F., Majeed H., Qi J., Yokoyama W., Zhong F. Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan–tripolyphosphate nanoparticles // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2015. – Vol. 465. – P. 137-146.
47. Wang Y., Li P., Kong L. Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles with Versatile Surface for Improved Drug Delivery // *AAPS PharmSciTech*. – 2013. – Vol. 14. – № 2. – P. 585-592.
48. Qi L., Xu Z., Jiang X., Hu C., Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles // *Carbohydrate Research*. – 2004. – Vol. 339. – P. 2693-2700.
49. Janes K.A., Fresneau M.P., Marazuela A., Fabra A., Alonso M.J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin // *Journal of Controlled Release*. – 2001. – Vol. 73. – P. 255-267.
50. Berger J., Reist M., Mayer J. M., Felt O., Peppas N. A., Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2004. – Vol. 57. – №. 1. – P. 19-34.
51. Bhumkar D. R., Pokharkar V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note // *AAPS Pharmscitech*. – 2006. – Vol. 7. – №. 2. – P. 138-143.
52. Mi F. L., Shyu S. S., Lee S. T., Wong T. B. Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chi-

tosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. – 1999. – Vol. 37. – №. 14. – P. 1551-1564.

53. Mengatto L., Ferreyra M. G., Rubiolo A., Rintoul I., Luna J. Hydrophilic and hydrophobic interactions in cross-linked chitosan membranes // *Materials Chemistry and Physics*. – 2013. – Vol. 139. – №. 1. – P. 181-186.

54. Bahreini E., Aghaiypour K., Abbasalipourkabir R., Mokarram A. R., Goodarzi, M. T., Saidijam M. Preparation and nanoencapsulation of l-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study // *Nanoscale research letters*. – 2014. – Vol. 9. – №. 1. – P. 1-13.

55. Goycoolea F. M., El Gueddari N. E., Remuñán-López C., Coggiola A., Lollo G., Domard A., Alonso M. J. Effect of molecular weight and degree of acetylation on the physicochemical characteristics of chitosan nanoparticles // *Advances in Chitin Science X*. – 2007. – P. 542-547.

56. Ganji F., Abdekhodaie M. J., Sa A. R. Gelation time and degradation rate of chitosan-based injectable hydrogel // *Journal of sol-gel science and technology*. – 2007. – Vol. 42. – №. 1. – P. 47-53.

57. Xia S., Tan C., Xue J., Lou, X., Zhang X., Feng B.. Chitosan/tripolyphosphate-nanoliposomes core-shell nanocomplexes as vitamin E carriers: shelf-life and thermal properties // *International Journal of Food Science & Technology*. – 2014. – Vol. 49. – №. 5. – P. 1367-1374.

58. Managoli N. S., Kulkarni R. V., Ramarao N., Muchandi I. S. Crosslinked chitosan hydrogel matrix tablets for controlled release of gabapentin // *Farmacia*. – 2012. – Vol. 60. – №. 2. – P. 272-286.

59. Петрович Ю.А., Григорьянц Л.А., Гурин А.Н., Гурин Н.А. Хитозан. Структура и свойства. Использование в медицине и стоматологии // *Стоматология*. – 2008. – Т. 87. – № 4. – С. 72-78.

60. Langer R., Vacanti J.P. Ingénierie tissulaire // *Journal of Tissue Science & Engineering*. – 1993. – Vol. 260. – № 5110. – P.920–926.

61. Кильдеева Н.Р., Касаткина М.А., Дроздова М.Г., Демина Т.С., Успенский С.А., Михайлов С.Н., Марквичева Е.А. Биодegradуемые матриксы на основе хитозана: получение, изучение свойств и использование для культивирования животных клеток // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52. – №5. – С. 504-512.
62. Sacco P., Borgogna M., Travan A., Marsich E., Paoletti S., Asaro F., Donati I. Polysaccharide-based networks from homogeneous chitosan-tripolyphosphate hydrogels: synthesis and characterization // Biomacromolecules. – 2014. – Vol. 15. – №. 9. – P. 3396-3405.
63. Seol Y. J., Lee J. Y., Park Y. J., Lee Y. M., Rhyu I. C., Lee S. J., Chung C. P. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation // Biotechnology letters. – 2004. – Vol. 26. – №. 13. – P. 1037-1041.
64. Muzzarelli R. A. A., Muzzarelli C. Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences // Polysaccharides I. – Springer Berlin Heidelberg, 2005. – С. 151-209.
65. Hsieh C. Y., Tsai S. P., Ho M. H., Wang D. M., Liu C. E., Hsieh C. H., Hsieh H. J. Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds // Carbohydrate Polymers. – 2007. – Vol. 67. – №. 1. – P. 124-132.
66. Sarkar S. D., Farrugia B. L., Dargaville T. R., Dhara S. Physicochemical/biological properties of tripolyphosphate cross-linked chitosan based nanofibers // Materials Science and Engineering: C. – 2013. – Vol. 33. – №. 3. – P. 1446-1454.
67. López-León T., Carvalho E. L. S., Seijo B., Ortega-Vinuesa J. L., Bastos-González D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior // Journal of Colloid and Interface Science. – 2005. – Vol. 283. – №. 2. – P. 344-351.

68. Kaloti M., Bohidar H. B. Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan–sodium tripolyphosphate solutions // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2010. – Vol. 81. – №. 1. – P. 165-173.
69. Aryaei A., Jayatissa A. H., Jayasuriya A. C. Nano and micro mechanical properties of uncross-linked and cross-linked chitosan films // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. – 2012. – Vol. 5. – №. 1. – P. 82-89.
70. Sinha V. R., Singla A. K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs // *International journal of pharmaceutics*. – 2004. – Vol. 274. – №. 1. – P. 1-33.
71. Mi F. L., Huang C. T., Liang H. F., Chen M. C., Chiu, Y. L., Chen C. H., Sung H. W. Physicochemical, antimicrobial, and cytotoxic characteristics of a chitosan film cross-linked by a naturally occurring cross-linking agent, aglycone geniposidic acid // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2006. – Vol. 54. – № 9. – P. 3290-3296.
72. Ильина А.В., Левов А.Н., Орлов В.Н., Будашов И.А., Варламов В.П. Получение наночастиц на основе производных хитозана и перспективы их использования // *Материалы Девятой Международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана»*. – Ставрополь. – 2008. – С. 61-65.
73. Ильина А.В., Варламов В.П., Ермаков Ю.А., Орлов В.Н., Скрыбин К.Г. Хитозан – природный полимер для формирования наночастиц // *Доклады академии наук*. – 2008. – Т. 421. – № 2. – С. 199-201.
74. Lee D. H., Kang I. J. Drug delivery system using biodegradable nanoparticles carrier // *KONA Powder and Particle Journal*. – 2006. – Vol. 24. – № 0. – P. 159-166.
75. Gupta P., Vermani K., Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery // *Drug discovery today*. – 2002. – Vol. 7. – № 10. – P. 569-579.

76. Gordon S., Saupe A., McBurney W., Rades T., Hook S. Comparison of chitosan nanoparticles and chitosan hydrogels for vaccine delivery // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2008. – Vol. 60. – № 12. – P. 1591-1600.
77. Nettles D. L., Elder S. H., Gilbert J. A. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering // *Tissue engineering*. – 2002. – Vol. 8. – № 6. – P. 1009-1016.
78. Prashanth K. V. H., Tharanathan R. N. Crosslinked chitosan—preparation and characterization // *Carbohydrate research*. – 2006. – Vol. 341. – № 1. – P. 169-173.
79. Beppu M. M., Vieira R. S., Aimoli C. G., Santana C. C. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption // *Journal of membrane science*. – 2007. – Vol. 301. – № 1. – P. 126-130.
80. Singh A., Narvi S. S., Dutta P. K., Pandey N. D. External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde // *Bulletin of Materials Science*. – 2006. – Vol. 29. – № 3. – P. 233-238.
81. Du W. L., Niu S. S., Xu Z. R., Xu Y. L. Preparation, characterization, and adsorption properties of chitosan microspheres crosslinked by formaldehyde for copper (II) from aqueous solution // *Journal of applied polymer science*. – 2009. – Vol. 111. – № 6. – P. 2881-2885.
82. Oliveira B. F., Santana M. H. A., Ré M. I. Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with d, l-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization // *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. – 2005. – Vol. 22. – № 3. – P. 353-360.
83. Devi D. A., Smitha B., Sridhar S., Aminabhavi T. M. Pervaporation separation of isopropanol/water mixtures through crosslinked chitosan membranes // *Journal of membrane science*. – 2005. – Vol. 262. – № 1. – P. 91-99.
84. Ghazali M., Nawawi M., Huang R. Y. M. Pervaporation dehydration of isopropanol with chitosan membranes // *Journal of Membrane Science*. – 1997. – Vol. 124. – № 1. – P. 53-62.

85. Choudhari S. K., Kittur A. A., Kulkarni S. S., Kariduraganavar M. Y. Development of novel blocked diisocyanate crosslinked chitosan membranes for pervaporation separation of water–isopropanol mixtures // *Journal of Membrane Science*. – 2007. – Vol. 302. – № 1. – P. 197-206.
86. Liu Y. L., Su Y. H., Lai J. Y. In situ crosslinking of chitosan and formation of chitosan–silica hybrid membranes with using  $\gamma$ -glycidoxypropyltrimethoxysilane as a crosslinking agent // *Polymer*. – 2004. – Vol. 45. – № 20. – P. 6831-6837.
87. Vieira R. S., Beppu M. M. Interaction of natural and crosslinked chitosan membranes with Hg (II) ions // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2006. – Vol. 279. – № 1. – P. 196-207.
88. Zeng X., Ruckenstein E. Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations // *Journal of Membrane Science*. – 1998. – Vol. 148. – № 2. – P. 195-205.
89. Yang Q., Dou F., Liang B., Shen Q. Investigations of the effects of glyoxal cross-linking on the structure and properties of chitosan fiber // *Carbohydrate polymers*. – 2005. – Vol. 61. – № 4. – P. 393-398.
90. Yang Q., Dou F., Liang B., Shen Q. Studies of cross-linking reaction on chitosan fiber with glyoxal // *Carbohydrate polymers*. – 2005. – Vol. 59. – № 2. – P. 205-210.
91. Knaul J. Z., Hudson S. M., Creber K. A. M. Crosslinking of chitosan fibers with dialdehydes: Proposal of a new reaction mechanism // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. – 1999. – Vol. 37. – № 11. – P. 1079-1094.
92. Kuznetsova N. P., Mishaeva R. N., Gudkin L. R., Panarin E. F. Reactions of glutaraldehyde with dipolar ions of amino acids and proteins // *Russian Chemical Bulletin*. – 2013. – Vol. 62. – № 4. – P. 918-927.
93. Meade S. J., Miller A. G., Gerrard J. A. The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure–activity study // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2003. – Vol. 11. – № 6. – P. 853-862.

94. Takigawa T., Endo Y. Effects of glutaraldehyde exposure on human health // *Journal of occupational health*. – 2006. – Vol. 48. – № 2. – P. 75-87.
95. Wine Y., Cohen-Hadar N., Freeman A., Frolow F. Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis // *Biotechnology and bioengineering*. – 2007. – Vol. 98. – № 3. – P. 711-718.
96. Кильдеева Н.Р., Перминов П.А., Владимиров Л.В., Новиков В.В., Михайлов С.Н. О механизме реакции глутарового альдегида с хитозаном // *Биоорганическая химия*. – 2009. – Т. 35. – С. 397-407.
97. Перминов П.А., Кильдеева Н.Р., Вихорева Г.А., Владимиров Л.В., Аكوпова Т.А., Бабак В.Г. Изучение взаимодействия хитозана с глутаровым альдегидом // *Материалы Восьмой Международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана»*. – Казань. – 2006. – С. 119-122.
98. Mi F. L., Kuan C. Y., Shyu S. S. The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release // *Carbohydrate polymers*. – 2000. – Vol. 41. – № 4. – P. 389-396.
99. Poon L., Wilson L. D., Headley J. V. Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties // *Carbohydrate polymers*. – 2014. – Vol. 109. – P. 92-101.
100. Gupta K. C., Jabrail F. H. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman // *Carbohydrate research*. – 2006. – Vol. 341. – № 6. – P. 744-756.
101. Rohindra D. R., Nand A. V., Khurma J. R. Swelling properties of chitosan hydrogels // *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*. – 2004. – Vol. 22. – № 1. – P. 32-35.

102. Song Y., Tan S., Sun J., Zhang J., Wu M., Wu Q., Yang J. Synthesis and sustained release property of drug-loaded chitosan microspheres by spray drying technique // *Am. J. Macromol. Sci.* – 2015. – Vol. 2. – P. 1-10.
103. Pujana M. A., Pérez-Álvarez L., Iturbe L. C. C., Katime I. Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin // *Carbohydrate polymers.* – 2013. – Vol. 94. – № 2. – P. 836-842.
104. Muzzarelli R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids // *Carbohydrate Polymers.* – 2009. – Vol. 77. – № 1. – P. 1-9.
105. Hou Y. C., Tsai S. Y., Lai P. Y., Chen Y. S., Chao P. D. L. Metabolism and pharmacokinetics of genipin and geniposide in rats // *Food and Chemical Toxicology.* – 2008. – Vol. 46. – № 8. – P. 2764-2769.
106. Butler M. F., Ng Y. F., Pudney P. D. A. Mechanism and kinetics of the cross-linking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry.* – 2003. – Vol. 41. – № 24. – P. 3941-3953.
107. Mi F.L., Shyu S.S., Peng C.K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin // *Journal of Polymer Science: Part A.* – 2005. – Vol. 43. — P. 1985-2000.
108. Roughley P., Hoemann C., DesRosiers E., Mwale F., Antoniou J., Alini M. The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27. – № 3. – P. 388-396.
109. Sung H. W., Huang R. N., Huang L. L., Tsai L. L. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation // *Journal of Biomaterials Science.* – 1999. – Vol. 10. – P. 63–78.
110. Wang C., Lau T. T., Loh W. L., Su K., Wang D. A. Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker—Genipin with therapeutic model cells // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* – 2011. – Vol. 97. – № 1. – P. 58-65.

111. Kaminski K., Zazakowny K., Szczubiałka K., Nowakowska M. pH-sensitive genipin-cross-linked chitosan microspheres for heparin removal // *Biomacromolecules*. – 2008. – Vol. 9. – № 11. – P. 3127-3132.
112. Mi F. L., Sung H. W., Shyu S. S. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2000. – Vol. 38. – № 15. – P. 2804-2814.
113. Mi F. L., Tan Y. C., Liang H. C., Huang R. N., Sung H. W. In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin // *Journal of Biomaterials Science*. – 2001. – Vol. 12. – № 8. – P. 835-850.
114. Kim I. Y., Moon H. S., Park I. Y. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications // *Biotechnology advances*. – 2008. – Vol. 26. – № 1. – P. 1-21.
115. Sampaio G. Y. H., Fook A. C., Fidèles T. B., Cavalcanti M. E. R. R. M., Fook M. V. L. Biodegradable chitosan scaffolds: effect of genipin crosslinking // *Materials Science Forum*. – 2015. – Vol. 805. – P. 116-121..
116. Kumari R., Dutta P. K. Physicochemical and biological activity study of genipin-crosslinked chitosan scaffolds prepared by using supercritical carbon dioxide for tissue engineering applications // *International journal of biological macromolecules*. – 2010. – Vol. 46. – № 2. – P. 261-266.
117. Ji C., Khademhosseini A., Dehghani F. Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – № 36. – P. 9719-9729.
118. Nikonorov V. V., Perminov P. A., Kil'deeva N. R. Crosslinking in solutions of chitosan in the presence of a crosslinking reagent for production of fibre biocatalysts // *Fibre Chemistry*. – 2006. – Vol. 38. – № 2. – P. 95-97.
119. Schiffman J. D., Schauer C. L. Cross-linking chitosan nanofibers // *Biomacromolecules*. – 2007. – Vol. 8. – № 2. – P. 594-601.

120. Schiffman J. D., Schauer C. L. One-step electrospinning of cross-linked chitosan fibers // *Biomacromolecules*. – 2007. – Vol. 8. – № 9. – P. 2665-2667.
121. Jin J., Hourston D. J., Song M. Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties // *Biomacromolecules*. – 2004. – Vol. 5. – № 1. – P. 162-168.
122. Silva R. M., Silva G. A., Coutinho O. P., Mano J. F., Reis R.L. Preparation and characterisation in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2004. – Vol. 15. – № 10. – P. 1105-1112.
123. Song X., Wu H., Li S., Wang Y., Ma X., Tan, M. Ultrasmall chitosan–genipin nanocarriers fabricated from reverse microemulsion process for tumor photothermal therapy in mice // *Biomacromolecules*. – 2015. – Vol. 16. – № 7. – P. 2080-2090.
124. Harris R., Lecumberri E., Heras A. Chitosan-genipin microspheres for the controlled release of drugs: clarithromycin, tramadol and heparin // *Marine drugs*. – 2010. – Vol. 8. – № 6. – P. 1750-1762.
125. Li Y. H., Cheng C. Y., Wang N. K., Tan H. Y., Tsai Y. J., Hsiao C. H., Yeh L. K. Characterization of the modified chitosan membrane cross-linked with genipin for the cultured corneal epithelial cells // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2015. – Vol. 126. – P. 237-244.
126. Li Q., Wang X., Lou X., Yuan H., Tu H., Li B., Zhang Y. Genipin-crosslinked electrospun chitosan nanofibers: Determination of crosslinking conditions and evaluation of cytocompatibility // *Carbohydrate polymers*. – 2015. – Vol. 130. – P. 166-174.
127. Е452 Полифосфаты / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: URL: <http://www.calorizator.ru/addon/e4xx/e452>. (дата обращения: 17.05.2016).
128. Полифосфат / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: URL: <http://pigulka.ru/polifosfat.php>. (дата обращения: 17.05.2016).

129. Dean J.A. (Ed.) Lange's Handbook of Chemistry 13th Edition // McGraw-Hill. - New York. - 1972. - P. 16–17..
130. Pierog M., Gierszewska-Drużyńska M., Ostrowska-Czubenko J. Effect of ionic crosslinking agents on swelling behavior of chitosan hydrogel membranes // Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. – 2009. – Vol. 14. – P. 75-82.
131. Corbridge D.E.C., Lowe E.J. The infra-red spectra of some inorganic phosphorus compounds // Journal of the Chemical Society. – 1954. – №0. – P. 493-502.
132. Thomas S. Wound Management and Dressings. London: Pharmaceutical Press, 1990. – 224p.
133. Михайлов С.Н., Гаврюшов С.А., Касаткина М.А., Кильдеева Н.Р. Об определении степени сшивки хитозана в реакции с диальдегидами // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2016. – №3(1). – С. 87-90.
134. Никоноров В.В., Перминов П.А., Кильдеева Н.Р. Закономерности структурообразования в растворах хитозана в присутствии сшивающего реагента для получения волокнистых биокатализаторов // Химические волокна. – 2006. - №2. - С.9-11.
135. Перминов П.А. Закономерности взаимодействия хитозана с глутаровым альдегидом и их использование при получении ферментсодержащих полимерных материалов: дис. ... канд. хим. наук.- М.: МГТУ, 2007. - 152с.
136. Кильдеева Н.Р., Касаткина М.А., Михайлов С.Н. Особенности получения биосовместимых пленок на основе хитозана, сшитого дженипином // Все материалы. Энциклопедический справочник. – 2016. – №4. – С. 9-14.
137. Félix L., Hernandez J., Arguelles-Monal W.M., Goycoolea F.M. Kinetics of gelation and thermal sensitivity of N-isobutyryl chitosan hydrogels // Biomacromolecules. – 2005. – Vol. 6. – № 5. – P. 2408-2415
138. Mikhailov S.N., Zakharova A.N., Drenichev M.S., Ershov A.V., Kasatkina M.A., Vladimirov L.V., Novikov V.V., Kildeeva N.R. // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2016. V.35. № 3. P.114-129.

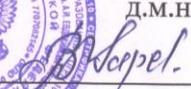
139. Ramos-Ponce L.M., Vega M., Sandoval-Fabian G.C., Colunga-Urbina E., Balagurusamy N., Rodriguez-Gonzalez F.J., Contreras-Esquivel J.C. A simple colorimetric determination of the free amino groups in water soluble chitin derivatives using genipin // *Food Sci. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 19. – № 3. – P. 683-689.
140. Чалых А.Е., Петрова Т.Ф., Хасбиуллин Р.Р., Озерин А.Н. Сорбция и диффузия воды в хитине и хитозане // *Высокомолекулярные соединения. Серия А.* – 2014. – Т. 56. – С. 526-535.
141. Чалых А.Е., Кильдеева Н.Р., Касаткина М.А., Петрова Т.Ф., Герасимов В.К., Матвеев В.В., Хасбиуллин Р.Р. Структура и свойства пленок хитозана, сшитого дженипином // *Сборник статей XXIII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем».* – 2016. – № 23. – С. 36-45.
142. Тагер А.А. Физико-химия полимеров. – М.: Научный мир, 2007. – 576 с.
143. Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D.S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review // *International Journal of Polymer Science.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 1-19.
144. Cheung H.Y., Lau K.T., Lu T.P., Hui D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development // *Composites Part B: Engineering.* – 2007. – Vol. 38. – № 3. – P. 291-300.
145. De Isla N., Huseltein C., Jessel N., Pinzano A., Decot V., Magdalou J., Stoltz J.F. Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering // *Bio-medical materials and engineering.* – 2010. – Vol. 20. – № 3-4. – P. 127-133.
146. Новочадов В.В. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща (обзор литературы) // *Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11. Естественные науки.* – 2013. – № 1. – С. 19-28.
147. Mi F.L., Tan Y.C., Liang H.F., Sung H.W. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant // *Biomaterials.* – 2002. – Vol. 23. – № 1. – P.181–191.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИМСИ МГМСУ,  
Заслуженный работник  
высшей школы Российской Федерации,  
д.м.н., профессор



 В.Н.Царёв

2014г.  
М.П.

### АКТ ВНЕДРЕНИЯ

о внедрении в практику Клинико-диагностического центра Московского государственного медико-стоматологического университета результатов диссертационной работы Касаткиной М.А. по теме: «Использование сшивающих реагентов для получения материалов медико-биологического назначения на основе гидрогелей биосовместимых полимеров».

Настоящая справка удостоверяет, что результаты диссертационной работы Касаткиной М.А. использовались при проведении антимикробной и противовоспалительной терапии в полости рта раневыми покрытиями на основе хитозана (модифицированного триполифосфатом натрия), содержащими антимикробные препараты, с мая 2014 года.

Антимикробная активность исследовалась в лаборатории Молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, которая показала, что раневые покрытия обладают высокой антибактериальной активностью к грамположительным и грамотрицательным бактериям, противогрибковой активностью.

Полученные результаты исследований целесообразно использовать для внедрения в пародонтологии, терапевтической, хирургической и ортопедической стоматологии.

Старший научный сотрудник

Лаборатории молекулярно-биологических

исследований НИМСИ МГМСУ

им. А.И. Евдокимова, к.м.н., доцент

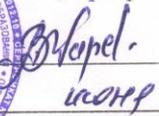


Е.В. Ипполитов

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИМСИ МГМСУ,  
Заслуженный работник высшей  
школы Российской Федерации,  
д.м.н., профессор



  
В.Н.Царёв  
2014г.  
М.П.

## ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

от «17» июня 2014 г.

1. **Наименование заказчика:** ФГБОУ ВПО «МГУДТ»
2. **Наименование продукции, ее характеристика и обозначение:** раневое покрытие на основе хитозана, модифицированное триполифосфатом натрия, содержащее антимикробные препараты: хлоргексидина биглюконат и фурагин.

Таблица 1 – Характеристика образцов

№	Наименование антимикробного вещества	Концентрация антимикробного препарата, %
1	–	–
2	Хлоргексидина биглюконат	5
3		1
4	Фурагин	1
5		0,5

3. **Цель испытаний:** исследование антимикробной активности образцов пленок.
4. **Методы испытаний:** проверка антимикробного действия образцов осуществлялась методом диффузии в агар (ГФ СССР, XI изд., вып.2. – М., 1990, с.210-225) и в соответствии с Методическими Указаниями по лабораторной оценке антимикробной активности текстильных материалов, содержащих антимикробные препараты МЗ СССР (Москва, 1984 г.) по отношению к *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli* и *Candida Albicans*.

## 5. Аппаратура и реактивы

Линейка измерительная по ГОСТ 427.

Пинцет по ГОСТ 21341-89. Микробиологические среды.

Шкаф сушильный электрический круглый с диапазоном температур от +30<sup>0</sup>С до +200<sup>0</sup>С.

## 6. Результаты испытаний образцов представлены в таблице 2.

В контрольных образцах материала (хитозан без добавок) признаков антибактериальной или противогрибковой активности не выявлено. При исследовании опытных образцов содержащих антимикробные компоненты установлено, что образцы материалов (хитозан) содержащие 5% хлоргексидина биглюконата обладают наиболее высокой антибактериальной активностью (5-10 мм.) и противогрибковой активностью (12 мм.). В то время, как при концентрации 1% активность практически не определялась.

Следовательно, отмечалась зависимость от концентрации хлоргексидина биглюконата в представленных образцах.

Напротив, при исследовании образцов содержащих фурагин (1%и 0,5%), такой зависимости не обнаружено. Антибактериальная активность данных образцов была ниже и составляла 3-5 мм, и выявлялась только в отношении Грам + бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*), но не грибов. (Таблица 2.)

Таблица 2 – Результаты испытаний образцов

№	Размер образца, мм <sup>2</sup>	Зона ингибирования роста микроорганизмов, мм			
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida Albicans</i>
1	10	0	0	0	0
2	10	5	10	5	12
3	10	0	0	0	0
4	10	3	5	0	0
5	10	3	5	0	0

Исследование выполнено в лаборатории Молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института и на кафедре микробиологии Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова.

Старший научный сотрудник лаборатории  
молекулярно-биологических исследований  
НИМСИ МГМСУ им. А.И. Евдокимова,  
к.м.н., доцент



Е.В. Ипполитов