

На правах рукописи



ЧЕРНОГОРЦЕВА
Марина Вячеславовна

РАЗРАБОТКА ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ КОМПЛЕКСОВ С ХИТОЗАНОМ

Специальность 05.17.06 – Технология и переработка
полимеров и композитов

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

Москва
2019

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

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

Официальные оппоненты: **Олтаржевская Наталия Дмитриевна**
доктор технических наук, профессор, генеральный директор ООО «Колетекс»

Липатова Ирина Михайловна
доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт химии растворов им. Г.А. Крестова» РАН

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», г. Москва

Защита диссертации состоится «12» декабря 2019 года в 10⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 212.144.07 при ФГБОУ ВО «Российский государственный университет имени А.Н.Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)» по адресу: 117997 г. Москва, ул. Садовническая, д. 33, стр. 1, конференц-зал (156 ауд.).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Российский государственный университет имени А.Н.Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)» и на сайте университета <https://kosygin-rgu.ru>.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2019 года

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



Кузнецов Д.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Благодаря возобновляемости источников получения, экологической безопасности, биосовместимости и биологической активности полисахариды являются уникальным сырьем для создания полимерных материалов медико-биологического назначения. Гиалуронат натрия - соль гиалуроновой кислоты (ГК) – природный полисахарид, естественный компонент межклеточного вещества мягких тканей позвоночных. Важнейшие функции ГК в организме, выполняющей роль суставной смазки, поддерживающей регенерацию, гидратацию и упругость тканей, определяются особенностями строения и свойствами: полиэлектролитной природой, высокой влагоудерживающей способностью, растворимостью в воде, высокой вязкостью и способностью к гелеобразованию. Полиэлектролитные комплексы на основе биополимеров участвуют практически во всех биохимических процессах в живом организме, в связи с этим, разработка методов переработки гиалуроновой кислоты и хитозана в материалы биомедицинского назначения в виде интерполиэлектролитных комплексов является актуальной задачей, решение которой может послужить основой для создания новых биоподобных материалов, применяемых в регенеративной медицине и тканевой инженерии и сочетающих в себе оптимальные биологические свойства обоих компонентов.

В настоящее время различными отечественными и зарубежными научными коллективами показана возможность получения полимерных материалов медико-биологического назначения на основе комплексов хитозана и ГК. Однако, в технологии переработки биополимеров остаются актуальными задачи поиска новых путей управления процессом структурообразования в растворах полисахаридов и альтернативных решений по стабилизации полиэлектролитных комплексов при получении высокопористых гидрогелевых матриц для регенеративной медицины или модификации поверхности хирургических шовных нитей

Работа посвящена актуальной проблеме создания полимерных материалов для новых биомедицинских технологий и выполнялись в соответствии с приоритетными направлениями науки РФ в рамках Госзадания Минобрнауки РФ (проект №10.7554.2017/8.9) и грантов Российского фонда фундаментальных исследований №15-04-07669 и №18-29-17059.

Объекты исследования – ГК и интерполиэлектролитные комплексы (ИПЭК) на основе полисахаридов хитозана и гиалуроновой кислоты; сшитые гидрогели биополимеров; пористые биodeградируемые матрицы; методы получения материалов медико-биологического назначения.

Предмет исследования – научное обоснование методов получения материалов на основе гиалуроновой кислоты и ее полиэлектролитных комплексов.

Целью работы является разработка методов получения и модификации материалов медико-биологического назначения на основе гиалуроновой кислоты и ее комплексов с хитозаном.

В соответствии с поставленной целью в работе решены следующие **задачи**:

- изучены особенности вязкостных свойств и стабильность растворов гиалуроновой кислоты разной степени нейтрализации;
- изучены закономерности комплексообразования в системе хитозан-ГК-вода при разной кислотности среды и в присутствии стабилизирующих соединений;
- обоснованы оптимальные составы и условия получения биополимерных композиций на основе гиалуроновой кислоты и сшивающих реагентов, обеспечивающие заданные свойства гидрогелей;
- наработаны образцы и исследована цитотоксичность биodeградируемых пористых матриц на основе ГК, хитозана и ИПЭК хитозан-ГК;
- обоснована технология получения биосовместимой поверхностно-модифицированной хирургической шовной нити из натурального шелка;
- разработаны формовочные композиции и показана возможность электроформования нановолокнистых материалов из растворов, содержащих ГК и ее ИПЭК с хитозаном.

Методы исследования и технические средства решения задач.

С целью определения физико-химических свойств растворов биополимеров применялись методы вибрационной и ротационной вискозиметрии. Фазовое разделение системы хитозан - гиалуроновая кислота проводили с использованием нефелометрии, кондуктометрии и вискозиметрии. Получение композиционных матриц для тканевой инженерии осуществляли методом лиофильной сушки композиций и растворов ГК и хитозана. Степень набухания биополимерных пленок и биodeградируемых матриц изучали гравиметрическим методом. С применением метода атомно-силовой, оптической, конфокальной лазерной и сканирующей электронной микроскопии были изучены морфология матриц и распределение клеток при их культивировании. Получение нановолокнистых материалов на основе растворов ГК проводилось методом бескапиллярного электроформования. Цитотоксичность биополимерных матриц определяли с помощью метода тестирования экстрактов.

Исследования проводились на оборудовании кафедры химии и технологии полимерных материалов и нанокomпозитов и Центра коллективного пользования

Российского государственного университета им. А.Н. Косыгина, лаборатории термостойких термопластов ИСПМ им. Н.С. Ениколопова РАН, лаборатории полимеров для биологии ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Исследование цитотоксичности пористых гидрогелевых матрицсов проводилось н.с. ИБХ РАН Дроздовой М.А.

Научная новизна исследования:

- Впервые установлена взаимосвязь гидродинамических свойств и степени нейтрализации ГК, установлено, что стабильность вязкостных свойств уменьшается в ряду растворов с рН 6,5 > 3,5 > 4,3. Показано, что низкая стабильность растворов с рН 4,3, является результатом релаксационного процесса перераспределения плотности зарядов вдоль цепей поликислоты, приводящее к компактизации последних и снижению степени структурирования раствора.
- Изучено влияние ионной силы на процесс комплексообразования в растворах слабых полиэлектролитов хитозана и Н-формы ГК, что позволило выявить область гомогенности их растворов и получить гидрогели гиалуроновой кислоты и хитозана из общего растворителя.
- Установлена взаимосвязь состава биополимерных композиций на основе гиалуроновой кислоты и хитозана, физико-химических свойств растворов биополимеров, структуры и свойств сформированных композиционных матрицсов, степени фиксации клеток на их поверхности и возможности для их роста;
- Впервые выявлены особенности гелеобразования в водных растворах хитозана при его сшивке дженипином в присутствии этанола: введение спирта влияет на реакцию взаимодействия аминогрупп с дженипином, снижая скорость реакции и, соответственно увеличивая время начала гелеобразования в растворе хитозана.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выявленные закономерности и особенности комплексообразования хитозана с разными формами ГК позволяют воздействовать на параметры процесса получения гидрогелей и управлять их важнейшими структурными, осмотическими и морфологическими параметрами, что является эффективным инструментом регулирования свойств биоматериалов. Разработанные принципы получения композиционных матрицсов и параметры модифицирования поверхности хирургической шовной нити композициями на основе ИПЭК гиалуроновой кислоты и хитозана могут служить основой для технологии получения разных типов материалов для хирургии, регенеративной медицины и тканевой инженерии. Установлено влияние добавки остеокондуктивного компонента на структуру и пролиферацию клеток матрикса, на основе сшитого БДДЕ гидрогеля гиалуроновой кислоты.

Положения, выносимые на защиту:

– Результаты комплексных исследований вязкости, стабильности растворов ГК разной степени нейтрализации и комплексообразования в растворах хитозана и Н-формы ГК, которые составляют основу технологии переработки биополимеров из общего растворителя или поверхностной модификации нерастворимыми ИПЭК.

– Обобщенные данные по оценке структурных особенностей, физико-механических и функциональных свойств биополимерных матриц из ГК, хитозана и их ИПЭК, полученных с использованием сшивающих реагентов.

Апробация и реализация результатов работы.

Основные результаты работы были доложены на *Всероссийских научных конференциях*: Всероссийский конкурс научно-технического творчества молодежи НТТМ-2016 (Москва, 2016); Второй Всероссийский научный форум «Наука будущего — наука молодых» (Казань, 2016); XI Всероссийская инновационная молодежная научно-инженерная выставка «ПОЛИТЕХНИКА», (Москва, 2016). *Международных конференциях*: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016», (Москва, 2016); 7,8,9-th International conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues» including Russian–Hellenic workshop and School of Young Scientists (Ираклион, 2016;2017;2018); 3rd International Conference «Bio-Based Polymers and Composites» BiPoCo-2016 (Сегед, 2016); X Международный биотехнологический форум-выставка «РосБиоТех-2016» (Москва, 2016); Международный форум: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни, «БИОТЕХ 2018» (Москва, 2018); XIV Международная конференция «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана (РосХит-2018)» (Севастополь, 2018).

Публикации. Основные положения диссертационной работы опубликованы в **18** печатных работах, из которых **6** – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, **3** – индексируются в Web of Science.

Структура и объем работы. По своей структуре диссертационная работа состоит из введения, трех глав, общих выводов по работе, списка литературы, приложения. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 78 рисунков, 19 таблиц. Список литературы включает 198 библиографических и электронных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, обозначены цели и задачи исследований, отражены научная новизна и практическая значимость работы. **В**

первой главе, представленной литературным обзором показана значимость использования полисахаридов гиалуроновой кислоты и хитозана для создания материалов для биомедицинского применения, для каждого из полимеров рассмотрены методы модифицирования с целью получения матриц для регенеративной медицины, освящен метод электроформования как способ получения нановолокнистых матриц, изучены особенности применения полиэлектролитных комплексов хитозана и ГК в медицине. **Во второй главе**, методическом разделе, описаны объекты исследования, методики приготовления растворов хитозана и гиалуроновой кислоты, пленок и сшитых гидрогелей полисахаридов, высокопористых биополимерных матриц и методы их исследования. **В третьей главе** представлены результаты и их обсуждение.

1. Изучение гидродинамических свойств растворов гиалуроновой кислоты

С целью изучения условий приготовления и характеристики растворов хитозана и гиалуроновой кислоты, последующего управления процессом комплексообразования в их растворах и получения на их основе полимерных комплексов заданного состава, растворимости и физической формы были изучены реологические и гидродинамические свойства водных растворов Н-формы гиалуроновой кислоты. Возможность образования, стабильность и растворимость в воде ПЭК хитозана и гиалуроновой кислоты напрямую зависит от рН раствора и степени диссоциации функциональных групп. Исследования вязкостных свойств растворов гиалуроновой кислоты и стабильности их во времени проводились как для натриевой соли ГК (гиалуронате), так и для раствора ГК в Н-форме, полученной с использованием ионообменной смолы. Этот прием позволяет перейти к протонированной форме ГК без увеличения ионной силы раствора.

Показано, что наибольшей стабильностью обладают растворы ГК с рН 6,5 в то время, как вязкость раствора с рН 4,3 снижается в большей степени, чем при рН 3,5 – на 12-13% (кривые 3 и 6, рис.1). Большая степень падения вязкости раствора при рН 4,3 по сравнению с рН 3,5 не может быть связана с более высокой скоростью деструкции полимера. Кроме деструкции падение вязкости растворов полимеров при хранении может быть обусловлено конформационными превращениями цепей и снижение степени структурирования раствора. Не исключено, что в растворе ГК-0,5Na с рН 4,3, полученном частичной нейтрализацией раствора ГК-Н, в ходе выдерживания параллельно с гидролизом происходит перераспределение плотности отрицательных зарядов на цепях таким образом, что это приводит к уменьшению их электростатического отталкивания, компактизации цепей и, как следствие, более выраженному снижению вязкости растворов

именно в первые часы хранения. В то же время в растворе ГК-Н полученного с помощью ионного обмена, в которой практически нет диссоциированных карбоксильных групп подобная дополнительная компактизация цепей при хранении, очевидно, уже не имеет места, и снижение вязкости обусловлено только их деструкцией. Таким образом, при работе с ГК в Н-форме необходимо учитывать факт резкого снижения молекулярной массы полимера при длительном хранении и, соответственно, для получения ПЭК с хитозаном использовать только свежеприготовленные растворы ГК-Н.

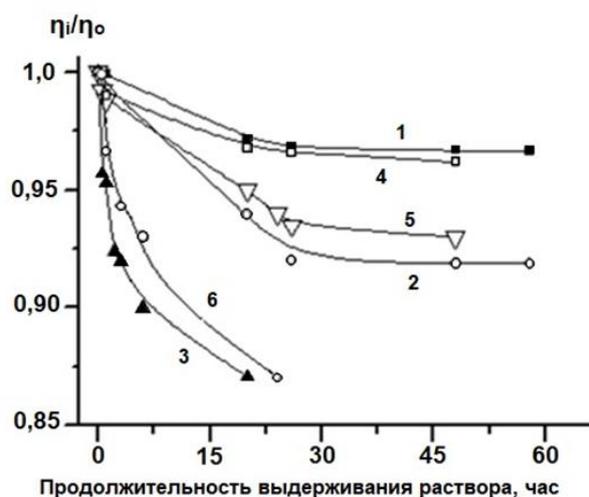


Рис. 1- Кинетика изменения вязкости 0,18 % (кривые 1-3) и 0,05 % (кривые 4-6) растворов ГК-На при pH 6,5 (кривые 1,4), ГК-0,5Na при pH 4,3 (кривые 3,6) и раствора ГК-Н при pH 3,5 (кривые 2,5)

лей гиалуроновой кислоты, в качестве сшивающего реагента может быть использован диглицидиловый эфир 1,4 бутандиола (БДДЕ), который вступает во взаимодействие, как с первичными, так и вторичными гидроксильными группами ГК с образованием простых или сложноэфирных связей.

Были получены структурированные гели ГК (ММ 1000 кДа), со степенью набухания от 1900% до 4000% в зависимости от соотношения БДДЕ/ГК моль/моль (таблица 1).

Таблица 1 - Влияние соотношения, сшивающий реагент – ГК на свойства гидрогеля ГК, сшитого БДДЕ. Концентрация полимера в смеси 16,2%

| № обр. | БДДЕ/ГК, моль/моль | Время сшивки, час | Степень набухания α , % | Модуль упругости G, кПа |
|--------|--------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------|
| 1 | 0,29 | 2 | 2000 | 210 |
| 2 | 0,2 | 2 | 1900 | 230 |
| 3 | 0,15 | 2 | 2100 | 260 |
| 4 | 0,1 | 2 | 4400 | 160 |
| 5 | 0,29 | 3 | 2330 | - |

2. Получение матриксов, на основе сшитых диглицидиловым эфиром 1,4 бутандиола гидрогелей гиалуроновой кислоты

Получение гидрогелей полимеров обуславливается образованием поперечных связей между линейными макромолекулами при модифицировании сшивающим реагентом и как результат – созданием трехмерной молекулярной сетки, обладающей отличными от раствора полимера реологическими и биологическими свойствами. Для получения не растворимых в воде гидрогелей гиалуроновой кислоты, в качестве сшивающего реагента может быть использован диглицидиловый эфир 1,4 бутандиола (БДДЕ), который вступает во взаимодействие, как с первичными, так и вторичными гидроксильными группами ГК с образованием простых или сложноэфирных связей.

Как видно из данных таблицы 1, повышение соотношения БДДЕ/ГК с 0,15 моль/моль до 0,29 моль/моль элементарных звеньев не влияет на степень набухания образца, что свидетельствует о достижении максимальной степени сшивки гиалуроновой кислоты. При снижении соотношения сшивающий реагент-ГК ниже 0,15 моль/моль степень набухания резко возрастает – до 4400%. Обратное пропорционально степени набухания изменяется модуль упругости гелей, набухших в воде до равновесного состояния, с 260 до 160 кПа, что является закономерным – чем больше воды содержится в гидрогеле, тем он больше подвержен деформации.

Гидрогели ГК, сшитые БДДЕ, были использованы для получения матриц - пористых биополимерных матриц для выращивания живых тканей, обеспечивающих возможность развития, прикрепления и пролиферации клеточных культур. Для этого синтезированные гидрогели выдерживали в воде до степени набухания 1000% и лиофильно высушивали. Цитотоксичность гидрогелей гиалуроновой кислоты (ММ 1000 кДа), была исследована в процессе культивирования модельной линии клеток НОS. Морфологию и распределение клеток оценивали после 7 дней культивирования (рис. 2).

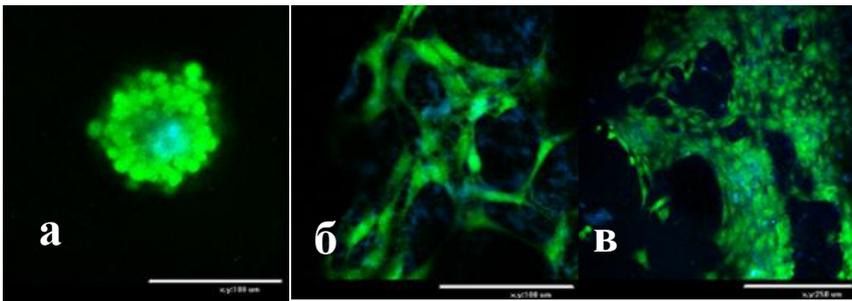


Рис. 2 - Микрофотографии клеток НОS после 7 дней культивирования в сшитых БДДЕ гидрогелях ГК: а – образец без ГАП; б – 1% ГАП; в – 10% ГАП

Как видно из данных рисунка, в процессе культивирования на гидрогеле гиалуроновой кислоты с гладкой поверхностью (рис. 3а) клетки НОS не распластывались, а образовывали клеточные агрегаты. С

целью усиления остеокондуктивных свойств гидрогелей и изменения клеточной адгезии в систему гиалуроновая кислота – БДДЕ был добавлен гидроксиапатит - основной компонент минеральной составляющей костной ткани в количестве 1% и 10%. Установлено, что добавление всего 1% ГАП приводило к адгезии и распластыванию клеток (рис. 3б), а в случае 10% ГАП (рис. 3в), клетки образовывали плотный монослой, формирующий живую ткань. Данные цитосовместимости, оцененные с помощью МТТ-теста для двух линий клеток L929 и НОS после 7 дней культивирования, указывают на положительное влияние остеокондуктивного компонента на жизнеспособность обоих типов клеток.

3. Изучение процесса комплексообразования в растворах гиалуроновой кислоты и хитозана

Наличие в составе хитозана и ГК реакционноспособных групп, а также способность этих полисахаридов к образованию полиэлектролитных комплексов, позволяет получить материалы, сочетающие оптимальные биологические свойства обоих компонентов. Комплексообразование в растворах гиалуроновой кислоты и хитозана было исследовано с целью изучения возможности получения на основе ИПЭК этих полиэлектролитов разных типов материалов медико-биологического назначения.

На рисунке 3 приведена зависимость вязкости ГК и хитозана от pH, которая была получена в контексте возможного образования комплекса полимеров. Вязкость раствора хитозана (кривая 1) падает при увеличении pH до 4,5 поскольку снижается степень ионизации аминогрупп, а при $\text{pH} \geq 4,5$ начинается осаждение полимера. У растворов поликислоты при увеличении pH с 3,5 до 8 – 8,5 и степени ионизации карбоксильных групп вязкость, наоборот, увеличивается. Дальнейшее увеличение pH за счет введения избытка NaOH из-за повышения ионной силы системы и экранирование зарядов приводит к снижению вязкости. Полученные данные позволяют определить области pH 3,5-4,5, в которой макромолекулы обоих полимеров, оставаясь в растворе, обладают наиболее компактной конформацией.

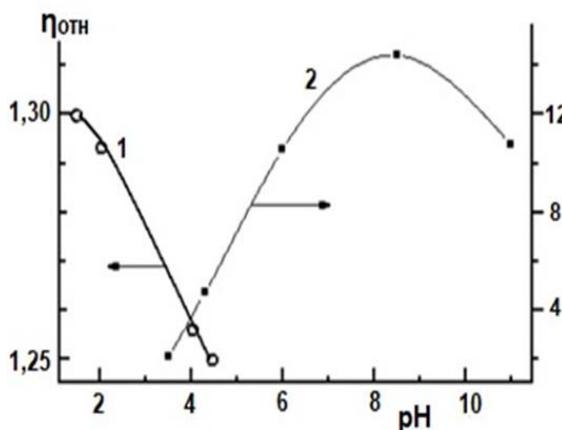


Рис. 3 - Зависимость относительной вязкости 0,05 % раствора хитозана (1) и 0,18 % раствора ГК (2) от pH

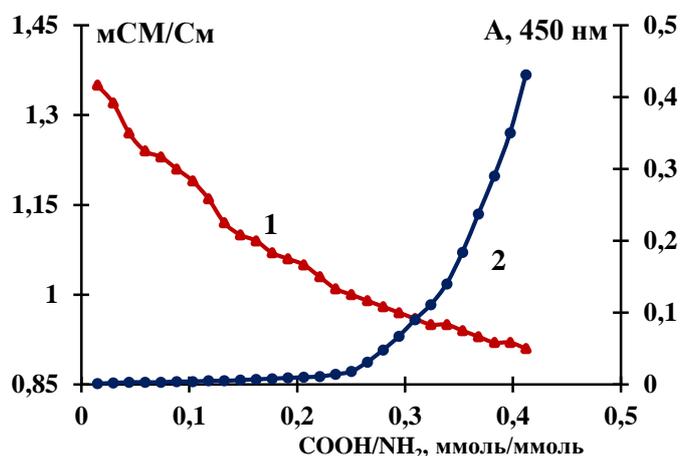


Рис. 4 – Кривые титрования 0,3% раствора Хит-190 раствором ГК-N при pH 3: 1 – зависимость оптической плотности раствора от соотношения COOH/NH_2 , 2 – кривая зависимости электропроводности раствора от соотношения COOH/NH_2

Образование не растворимых в воде полиэлектролитных комплексов связано, в основном, с двумя причинами: многоточечными электростатическими взаимодействиями между макромолекулами противоположно заряженных полиэлектролитов, приводящими к компактизации ассоциатов макромолекул в растворе; и снижением гидратации макромолекулы из-за уменьшения числа ионизованных групп, вовлекаемых в образование ионных связей.

Методом нефелометрического титрования 0,3%-го раствора хитозана эквивалентным раствором гиалуроновой кислоты в Н-форме была установлена концентрационная область, в которой образующиеся ПЭК полисахаридов являлись водорастворимыми (рис. 4). Свыше соотношения $\text{COOH}/\text{NH}_2 = 0,2$ ммоль/ммоль в системе появляются не растворимые в воде комплексы стехиометрического состава. Дальнейшее увеличение в растворе хитозана COOH групп, приводило к уменьшению значения электропроводности раствора за счет реакции нейтрализации (рис. 4, кривая 2) и как результат – образованию нерастворимых ИПЭК.

0,3%-ый раствор хитозана и ГК-Н можно использовать для получения наночастиц ИПЭК, но для формирования гидрогелей необходима большая концентрация, использование которой приводит к быстрому комплексообразованию в месте прибавления раствора и невозможности диспергировать образующийся ИПЭК. Был предложен прием, позволяющий увеличить концентрационную область существования гомогенного раствора полиэлектролитов за счет введения фонового электролита, позволяющего поддерживать постоянной ионную силу раствора. Было установлено, что образование водорастворимого комплекса хитозан-ГК возможно при введении в раствор полимеров сильного электролита NaCl концентрацией 0,4-0,5 моль/л. Однако следует отметить, что высокая концентрация соли в растворе биополимеров (NaCl 0,5 моль/л) может повлиять на процесс порообразования при лиофильном высушивании гидрогелей, и оказать неблагоприятное воздействие на выживаемость клеток, поэтому в процесс получения гидрогелей необходимо включать стадию его промывки гидрогеля от избытка электролита или диализ.

4. Изучение условий образования нерастворимых ИПЭК на основе хитозана и гиалуроновой кислоты

В результате комплексообразования между гиалуроновой кислотой и хитозаном в широкой концентрационной области образуются нерастворимые в воде комплексы. Этот факт может быть использован для получения различных материалов: наночастиц, капсул, поверхностных покрытий из ИПЭК хитозана и ГК. Была исследована возможность реакции комплексообразования в результате

добавления к раствору ГК в Н-форме (рН 3,5) твердого хитозана в форме полиоснования. Было установлено, что взаимодействие между функциональными группами полиэлектролитов хитозана и ГК-Н происходит только на поверхности частиц твердого хитозана, что значительно замедляет и делает невозможным диффузию длинных и объемных цепей ГК внутрь частиц твердого хитозана, тем самым приводя к образованию набухшего поверхностного слоя из ПЭК между полисахаридами. Однако, такой способ получения ПЭК перспективен для модификации твердых поверхностей полимерных материалов.

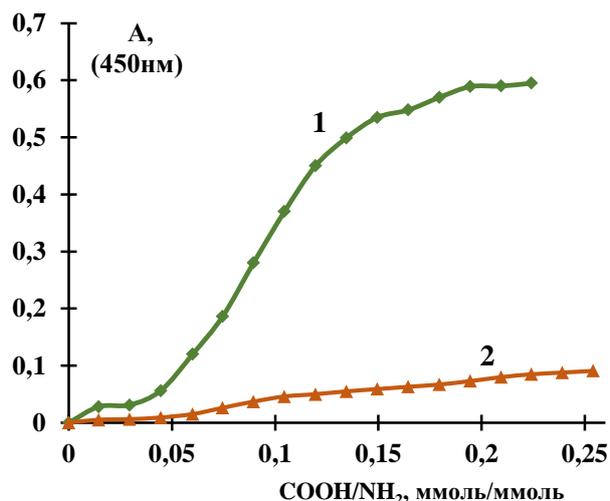


Рис. 5 - Нефелометрическое титрование раствора хитозана раствором ГК-Н, в присутствии 0,5 моль/л NaCl при: 1 – рН = 4,15; 2 – рН = 3

эквивалентного состава, что может указывать на образование стехиометрических ПЭК, частицы которых стабилизированы наибольшим числом ионных связей между полиэлектролитными цепями. На рисунке 6 показано, как с помощью дозированного внесения раствора ГК-Н в раствор хитозана можно получать гидрогели ПЭК в форме гранул.

Такой способ может быть использован для получения лекарственно-наполненных гранул или капсул.

Однако, прочность таких гидрогелевых была низкой, поэтому для получения стабильной системы следует использовать сшивающие реагенты.

5. Получение макропористых биodeградируемых матриц, на основе сшитого хитозана, модифицированных ИПЭК с ГК

Использование сшивающих реагентов позволяет получать на основе хитозана нерастворимые в воде, но обладающие высокой способностью к набуханию

Изучение закономерностей фазового разделения при смешении растворов хитозана (рН 4,5) и ГК (рН 5,6) в результате образования не растворимых в воде ИПЭК показало наличие широкой гетерогенной области составов. После смешения растворов фиксировали изменение фазового состояния систем, которое в некоторых случаях сопровождалось образованием белого творожистого осадка, наибольшее количество которого наблюдалось у смесей

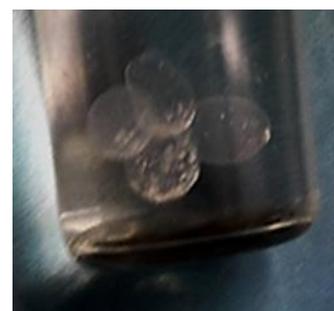


Рис. 6 - Гранулы ИПЭК хитозан-ГК.

гидрогели. Биodeградируемые матрицы были получены путем лиофильного высушивания сшитых гидрогелей хитозана. В качестве сшивающих реагентов, легко реагирующих с аминогруппами хитозана применялись глутаровый альдегид (ГА) и природное полифункциональное соединение дженипин (Дж). Для изучения влияния на цитотоксичность, влагоудерживающую способность, степень локализации клеток в полимерных матрицах были рассмотрены такие факторы, как молекулярная масса, степень сшивки, тип сшивающего реагента.



Рис. 7 - Фотографии макропористых матриц на основе сшитого Дж хитозана и его ИПЭК с ГК: 1 – матрикс без ГК-На; 2 – поверхностная модификация ГК-На; 3 – матрикс на основе дисперсии полимеров.

Композиционные гидрогели на основе хитозана молекулярной массы 320 кДа и 190 кДа модифицированные ГК (ММ 5 кДа и 30 кДа) были получены двумя способами: 1) адсорбцией ГК на поверхности

лиофильно высушенных гидрогелей сшитого хитозана; 2) формированием гидрогелей из дисперсии ПЭК сшитый хитозан - гиалуроновая кислота. В качестве контрольных образцов использовались лиофильно высушенные гидрогели хитозана соответствующей молекулярной массы, сшитые дженипином или ГА (таблица 2).

Таблица 2 – Состав и условия получения макропористых матриц на основе сшитого хитозана и ИПЭК с ГК

| № | Полимер / ММ, кДа | С, % | pH | Сшивающий реагент | Соотношение [Дж(ГА)]/[NH ₂] | С Дж(ГА), % | ГК ММ, кДа | Хит/ГК, г/г |
|---|-------------------|------|-----|-------------------|---|-------------|--|-------------|
| 1 | Хит - 320 кДа | 2,5 | 5,6 | ГА | 0,01 | 0,0525 | - | - |
| 2 | Хит - 320 кДа | 2,5 | 5,6 | Гр | 0,01 | 0,12 | - | - |
| 3 | Хит - 190 кДа | 4 | 5,6 | Гр | 0,003 | 0,059 | - | - |
| 4 | Хит - 320 кДа | 2,5 | 5,6 | ГА | 0,01 | 0,0525 | Поверхностная модификация ГК 5 кДа и 30 кДа | |
| 5 | Хит - 320 кДа | 2,5 | 5,6 | Гр | 0,01 | 0,12 | | |
| 6 | Хит - 190 кДа | 4 | 5,6 | Гр | 0,003 | 0,059 | | |
| 7 | Хит - 320 кДа | 2,5 | 5,6 | ГА | 0,01 | 0,4275 | 5 и 30 | 5:1 |
| 8 | Хит - 320 кДа | 2,5 | 5,6 | Гр | 0,01 | 0,95 | 5 и 30 | 5:1 |
| 9 | Хит - 190 кДа | 4 | 5,6 | Гр | 0,003 | 0,95 | 5 и 30 | 5:1 |

Условия сшивки (pH, соотношение С.р./NH₂) были выбраны на основании зависимостей времени гелеобразования от содержания сшивающего реагента. Цитотоксичность матриц на основе гидрогелей хитозана оценивали по

жизнеспособности клеток под действием экстрагируемых из матрикса веществ методом тестирования экстрактов. Было установлено, что количество жизнеспособных клеток в матриксах, полученных в отсутствие гиалуроновой кислоты значительно ниже, чем в образцах, ее содержащих.

Внутреннюю морфологию образцов макропористых биополимерных матриц, полученных лиофильным высушиванием гидрогелей хитозана, модифицированного ГК в объеме материала и поверхностно модифицированных, исследовали методом конфокальной микроскопии в режиме моделирования пористой структуры (рис. 8). Установлено, что полученные материалы обрабают системой сообщающихся пор размером 200-600 мкм, что позволяет их использовать в качестве матриксов для тканевой инженерии.

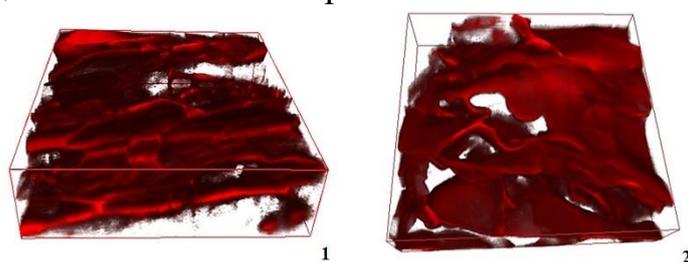


Рис. 8 - Конфокальная микроскопия в режиме моделирования пористой структуры макропористых биополимерных матриц, полученных лиофильным высушиванием гидрогелей хитозана, модифицированного ГК-На в объеме материала (1) и поверхностно модифицированных (2).

Введение гиалуроновой кислоты в состав матрикса на основе хитозана с ММ 320 кДа приводило к увеличению количества жизнеспособных клеток по сравнению с исходным образцом: на 16% для образца, полученного поверхностным модифицированием ГК-На и на 30% для объемно-модифицированного матрикса. Клетки на поверхности матриксов были распределены равномерно и на 4 день культивирования образовывали монослой (рис. 9).

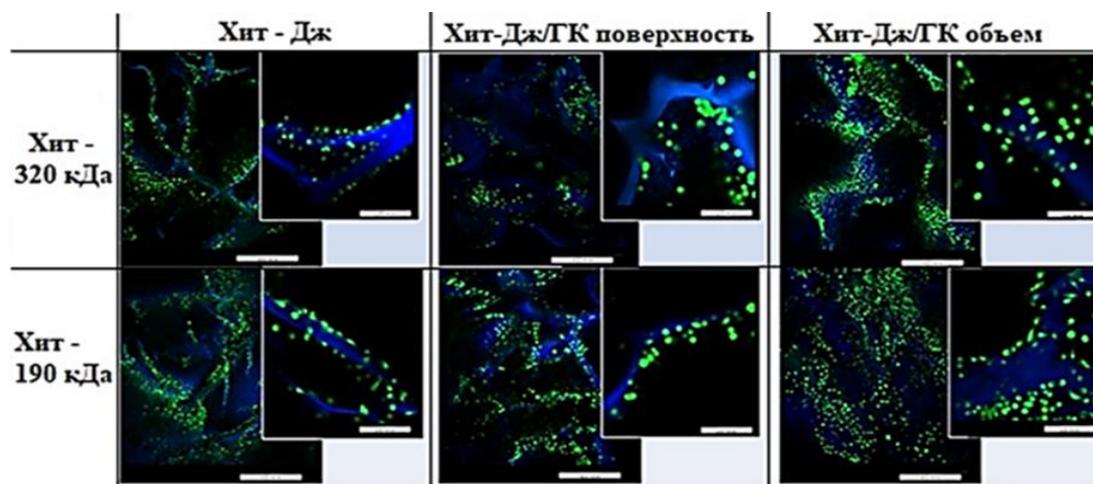


Рис. 9 - Распределение и морфология клеток линии L929 в матриксах на основе сшитого дже-нипином хитозана модифицированных ГК после 4 дней культивирования. Шкала 400 мкм

В целом проведенные исследования позволили выявить большую эффективность хитозановых матриц, содержащих ИПЭК с гиалуроновой кислотой, распределенные в объеме гидрогеля, по сравнению с поверхностно-модифицированными.

6. Получение нановолокон методом электроформования на основе ИПЭК хитозан-ГК в присутствии поливинилового спирта

Возможность электроформования из ИПЭК определяется способностью формовочной композиции к формированию струи в электрическом поле. В случае водных растворов полисахаридов этот процесс весьма затруднен, даже в случае растворов индивидуальных полимеров. Одним из наиболее распространенных способов придания прядомости растворам (полу-) жесткоцепных полимеров, является переработка растворов полимеров с использованием добавки гибкоцепного волокнообразующего компонента – таким как полиэтиленоксид или поливиниловый спирт.

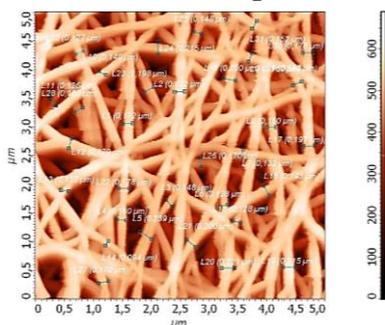


Рис. 10 – АСМ-изображения волокон полученных на основе сшитой ГА системы хитозан – ГК-Н - ПВС

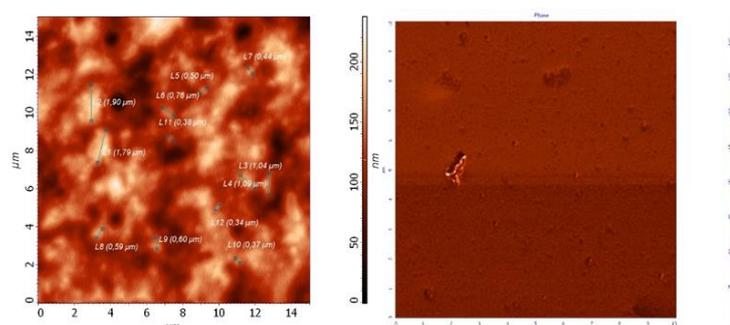


Рис. 11 - АСМ-изображения поверхности пленок на основе 2%-го хитозана (слева) и пленки полученной методом *spin-coating* на основе сшитой ГА системы хитозан -ГК-Н – ПВС (справа)

Были получены формовочные композиции на основе водного раствора волокнообразующего ПВС, содержащие тонкие дисперсии ПЭК хитозана и ГК. Состав формовочных композиции на основе ИПЭК хитозана и гиалуроновой кислоты и условия процесса электроформования приведены в таблице 3. Волокна формовали на установке с использованием метода бескапиллярного электроформования NS-LAB Nanospider при напряжении 29-33 кВ, с образованием на приемной подложке слоя нетканого волокнистого материала (рис. 10).

Увеличение содержания ГК в составе ПЭК приводит к уменьшению диаметра волокон, а при достижении содержания ГК в системе свыше 40% от массы полимеров формирование прекращается, что может быть связано как с увеличением вязкости формовочной композиции, так и увеличением размеров ПЭК, приводящим к обрывности волокна.

Таким образом, установлен состав формовочной композиции для электроформования волокнистого материала на основе ПВС, содержащего ПЭК хитозана с ГК.

Таблица 3 – Характеристика формовочного раствора

| № | Соотношение [хитозан:ГК-Н] | Концентрация ГК-Н в смеси, % | η , мПа*с | α , мСм/см | Характеристика ЭФ | d, нм |
|---|----------------------------|------------------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------|
| 1 | 5:0,5 | 0,2 | 675 | 1,73 | Стабильное | 224 |
| 2 | 5:1 | 0,4 | 743 | 1,81 | Стабильное | 177 |
| 3 | 5:2 | 0,8 | 1180 | 1,92 | Формования нет | - |

Методом атомно-силовой микроскопии была изучена пленка, полученная по технологии нанесения покрытия методом центрифугирования на основе композиции указанной в таблице 3. Как видно, (рис.11) на поверхности пленки наблюдаются наноразмерные образования, которые отсутствуют на поверхности пленки, не содержащей ГК. Это может служить дополнительным свидетельством наличия полиэлектrolитных комплексов полисахаридов.

7. Модифицирование хирургической шовной нити композициями на основе хитозана и ГК

Способность ГК образовывать нерастворимые в воде ИПЭК была использована при разработке метода модификации фиброиновой нити с целью повышения ее биосовместимости. Хирургические нити на основе натурального шелка обладают наилучшими манипуляционными свойствами и прочностью в узле. Однако присутствие в их составе серицина, вызывает аллергическую реакцию организма, что ограничивает использование такого шовного материала. Кроме того, способность фиброиновой нити впитывать в себя раневое отделяемое – фитильность, повышает риск возникновения воспалительного и нагноительного процессов. Поэтому повышение биосовместимости хирургической шовной нити является важной задачей.

Хитозан и ГК обладают противовоспалительными свойствами и, в отличие от белков, не вызывают воспалительных или иммунных реакций. Был предложен метод нанесения на поверхность фиброиновой нити последовательных слоев растворов хитозана и ГК, результатом которого является создание композитных нитей со структурой «ядро-оболочка». С целью предотвращения растворимости в воде

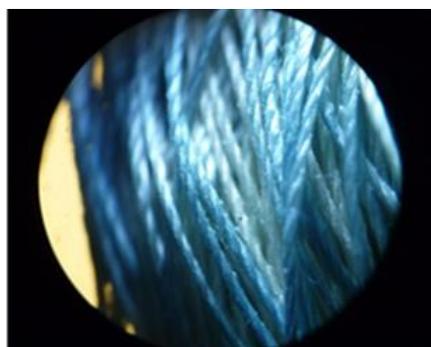


Рис. 12 - Фотография шовной нити из фиброина, поверхностно-модифицированной раствором хитозана в присутствии дженипина, и раствором ГК-Na

биополимерного покрытия в раствор хитозана вводили сшивающий реагент Дж. Вследствие особенностей строения дженипина и механизма его реакции с аминогруппами сшитые гидрогели и пленки хитозана могут быть окрашены в цвета от ярко-синего до темно зеленого (в зависимости от условий), что обеспечивает придание контрастности шовным нитям.

Путем нанесения на шелковую нить, модифицированную хитозаном, сшитым Дж, 1%-го раствора ГК-На был получен материал, содержащий 9,24% хитозана и 1,27% ГК в составе ИПЭК. Общий привес шелковой нити составил 11,6% (табл. 4). Полученная нить имела голубой цвет (рис. 12), что имеет дополнительное значение при использовании материала в хирургии. Сравнение АСМ-изображений исходной нити и модифицированной (рис.13) позволяет идентифицировать на поверхности исходной нити отдельные образования размером около 200 нм, как фазу ИПЭК хитозан-ГК, включенную в матрицу хитозана.

Таблица 4 – Характеристика процесса получения модифицированной шовной нити

| Концентрация полимера в растворе при послойном нанесении Хит/ГК, % | Дж/ NH_2 , моль/моль | Линейная плотности нити, текс | | Диаметр нити, мм | | Привес, % |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------|------------------|-------------|-----------|
| | | исходной | с покрытием | исходной | с покрытием | |
| 2 | 0,08 | 37,20 | 40,99 | 0,15-0,19 | 0,23 | 10,2 |
| 1 | 0,08 | 37,20 | 41,52 | 0,15-0,19 | 0,26 | 1,29 |
| 2/1 | 0,08 | 37,20 | 41,52 | 0,15-0,19 | 0,26 | 11,60 |

Таким образом, на основании изучения свойств растворов ГК и процесса комплексообразования ГК и хитозана были разработаны формовочные композиции и условия получения биосовместимых материалов:

- широкопористых биополимерных матриц для регенерации костной ткани на основе гидрогелей ГК, содержащих гидроксиапатит;
- биополимерных матриц для тканевой инженерии на основе гидрогелей хитозана, сшитого дженипином, содержащих ИПЭК с гиалуроновой кислотой;
- поверхностно модифицированной шовной нити из фиброина.

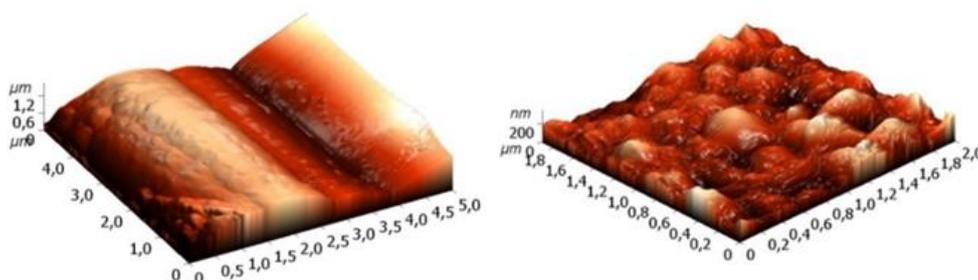


Рис. 13 - АСМ изображения исходной хирургической нити (слева) и шовной нити, модифицированной хитозаном и ГК-На (справа).

ВЫВОДЫ

Результаты проведенных в диссертационной работе исследований обеспечивают расширение современных представлений об особенностях получения полимерных материалов медико-биологического назначения на основе ГК и ее ИПЭК с хитозаном и позволяют сделать следующие выводы:

1. Впервые исследованы вязкостные свойства и стабильность водных растворов ГК с разной степенью нейтрализации и установлены особенности процесса комплексообразования Н-формы ГК и хитозана.
2. Установлена возможность получения водорастворимых комплексов гиалуроновая кислота-хитозан путем изменения рН и введения фонового электролита.
3. Разработаны методы получения и модификации материалов медико-биологического назначения на основе гиалуроновой кислоты и ее комплексов с хитозаном.
4. Разработаны два способа получения пористых биополимерных матриц: путем поверхностной модификации лиофильно высушенных гидрогелей хитозана, сшитого дженипином, и модификации в объеме бикомпонентного гидрогеля. В сравнительных экспериментах на живых клетках установлено отсутствие их цитотоксичности.
5. Установлено, что введение osteoconductive компонента (гидроксиапатит) позволяет контролировать архитектуру сшитых БДДЕ матриц гиалуроновой кислоты и влияет на культивирование и пролиферацию клеток по всему объему пористого материала;
6. Показана возможность получения методом электроформования нановолокнистого материала, содержащего ИПЭК ГК – хитозан с диаметром волокон 180 нм, с использованием ПВС в качестве волокнообразующей добавки.
7. Разработан процесс модификации хирургической шовной нити путем нанесения не растворимой в воде оболочки из сшитого хитозана и его полиэлектролитных комплексов с гиалуроновой кислотой. Разработана технологическая схема опытной установки по модификации шовных нитей.

Основное содержание диссертации опубликовано в работах:

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Успенский С. А., Кильдеева Н. Р., **Маслова М.В.**, Демина Т. С., Вихорева Г. А. Изучение стабильности вязкостных свойств растворов гиалуроновой кислоты для получения полиэлектролитных комплексов с хитозаном. // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2016. - № 1. – С. 273-276.

2. **Маслова М.В.**, Успенский С.А., Гальбрайт Л.С., Кильдеева Н.Р. Модифицирование хирургической шовной нити композициями на основе полисахаридов. // Химические волокна. – 2016. - №6. – С. 5-8.

3. Кильдеева Н.Р. Легонькова О.А., Коротаева А.И., **Черногорцева М.В.**, Новиков А.В. Получение гидрогелей на основе хитозана и гиалуроновой кислоты, сшитых диглицидиловым эфиром бутандиола. // Химические волокна. – 2019. - №3 . - С. 35-39.

4. М.Г. Дроздова, М.А. Водякова, Т.С. Демина, М.В. **Маслова**, С.А. Успенский, Н.Р. Кильдеева, Е.А. Марквичева. Макропористые биodeградируемые матриксы на основе хитозана и гиалуроновой кислоты для тканевой инженерии. // Известия Уфимского научного центра РАН. - 2016. - №3(1). - С. 29-31

5. Водякова М.А., Дроздова М.Г., **Маслова М.В.**, Касаткина М.А., Демина Т.С., Успенский С.А., Кильдеева Н.Р., Марквичева Е.А. Композиционные ковалентно сшитые гидрогели на основе хитозана и гиалуроновой кислоты для тканевой инженерии. // Журнал: Гены & клетки. – 2017. – Т. XII. - № 3. - С. 62.

6. Кильдеева Н.Р., **Черногорцева М.В.**, Пономарева П.Г, Успенский С.А.. Получение гидрогелей на основе хитозана и гиалуроновой кислоты сшитых диглицидиловым эфиром бутандиола. // Известия Уфимского научного центра РАН.- 2018. - №3 (3). - С. 65-70.

Публикации в других изданиях:

7. **Маслова М.В.** Модифицирование хирургической нити полимерными композициями на основе хитозана и гиалуроновой кислоты. // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2016» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2016. С.65.

8. **Маслова М.В.**, Евстратова О.Д. Получение композиционного хирургического шовного материала для пластической хирургии // Тезисы докладов 68 внутривузовской научной студенческой конференции «Молодые ученые – инновационному развитию общества (МИР-2016)». – Москва. - 2016. - С. 10.

9. N.R. Kildeeva, **M. V. Maslova**, T.S. Demina, S.A. Uspenskii, M.G. Drozdova, E.A. Markvicheva. Effect of hyaluronic acid on structure and properties of macroporous chitosan hydrogels // BIONANOTOX 2016. - 2016. - Heraklion, Crete-Greece. - P. 42.

10. **Маслова М.В.**, Евстратова О.Д. Разработка биodeградируемых матриксов на основе гидрогелей хитозана и гиалуроновой кислоты. // Сборник тезисов участников форума «Наука будущего – наука молодых». Казань.- 2016. — Т.2. – С. 426-428.

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

12. О.Д. Евстратова, **М.В. Маслова**. Получение биополимерных матриц на основе гиалуроновой кислоты с использованием бифункционального сшивающего реагента // Сборник материалов «ИНТЕКС-2017». – Москва. – 2017. – Ч. 2. – С. 20-22.

13. N. R. Kildeeva, **M.V. Maslova**, T. S. Demina, S. A. Uspenskii. Effects of crosslinking conditions on the properties of hyaluronic acid hydrogel // «BIONANOTOX 2017». – 2017. - Heraklion, Crete-Greece. – P. 40.

14. M. Vodiakova, M. Drozdova, T. Demina, S. Uspensky, **M.V. Maslova**, N. Kildeeva, E. Markvicheva. Covalently crosslinked chitosan hydrogels modified with hyaluronic acid: preparation and in vitro evaluation // «BIONANOTOX 2017». – 2017. - Heraklion, Crete-Greece. – P. 32.

15. Водякова М.А., Балабанова Г.В., Дроздова М.Г., **Маслова М.В.**, Касаткина М.А., Демина Т.С., Успенский С.А., Кильдеева Н.Р., Марквичева Е.А. Композиционные ковалентно сшитые гидрогели на основе хитозана и гиалуроновой кислоты для тканевой инженерии // XXIX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – 2017. – С. 162.

16. **М.В. Черногорцева**, Н.Р. Кильдеева, С.А. Успенский, Т.С. Демина, М.Г. Дроздова, Е.А. Марквичева. Биосовместимые матриксы на основе гиалуроновой кислоты для регенеративной медицины. // Международный форум: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни. – Москва. - 2018. – С. 214-215.

17. M. Stroilova, T. Balabanova, M. Drozdova, **M. Chernogortseva**, N. Sazhnev, T. Demina, S. Uspensky, N. Kildeeva, E. Markvicheva. Composite cross-linked hydrogels based on polysaccharides and fibroin for regenerative medicine // «BIONANOTOX 2018». – 2018. - Heraklion, Crete-Greece. – P. 45.

18. **Черногорцева М.В.**, Кильдеева Н.Р. Получение гидрогелей на основе хитозана и гиалуроновой кислоты, сшитых диглицидиловым эфиром бутандиола // Сборник материалов «ИННОВАЦИИ-2018». Часть 2. – 2018. – С. 155.