На правах рукописи

САЖНЕВ

Никита Александрович

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ МОДИФИКАЦИИ И ПЕРЕРАБОТКИ ФИБРОИНА В ВОЛОКНИСТЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ГИДРОГЕЛИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

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 – 2022

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

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой химии и технологии полимерных материалов и нанокомпозитов ФГБОУ ВО «РГУ им. А.Н. Косыгина»
Кильдеева Наталия Рустемовна

Официальные оппоненты: **Варламов Валерий Петрович,** доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией инженерии биополимеров Института биоинженерии имени академика К.Г. Скрябина Федерального исследовательского центра биотехнологии Российской академии наук
Устинова Татьяна Петровна, доктор технических наук, профессор, профессор кафедры «Технология и оборудование химических, нефтегазовых и пищевых производств» Энгельсского технологического института (филиал) ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.»

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород

Защита диссертации состоится «09» июня 2022 года в 10^{00} на заседании диссертационного совета Д 212.144.07, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный университет имени А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)» по адресу: г. Москва, ул. Малая Калужская, д. 1, онлайн-зал.

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 «___» __ 2022 года

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

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Биодеградируемые материалы на основе биополимеров широко используются при создании инновационных изделий медико-биологического назначения: рассасывающихся шовных нитей, имплантатов для пластической хирургии, матриц для клеточной и тканевой инженерии и регенеративной медицины. Актуальным является разработка новых биополимерных материалов и поиск методов управления их структурой и свойствами. В настоящей работе использованы криотехнологии, электроспининг и коагуляционное формование, а в качестве биодеградируемого полимерного сырья белок – фиброин из коконов тутового шелкопряда и аминополисахарид хитозан. Полученные из полисахаридов и белков гидрогелевые материалы, имитируют естественную среду организма и таким образом обеспечивают оптимальные условия для роста и регенерации тканей и деградируют под действием биологических сред.

Сформованные из регенерированного фиброина волокна и пленки растворимы в воде. Известный для хитозана метод предотвращения растворимости, улучшения водостойкости и механических свойств - химическое сшивание, - может быть недостаточно эффективным для фиброина, вследствие низкого содержания в этом белке первичных аминогрупп, однако добавление полисахарида может способствовать эффективности модификации бифункциональными реагентами. Кроме того, учитывая, что для фиброина известны несколько возможных конформационных состояний: растворимые в воде α-спирали или конформации статистического клубка и не растворимые β-складчатые структуры, создание условий для α→β конформационного перехода при формовании волокон и гидрогелей из регенерированного фиброина позволит воздействовать на растворимость полимерного материала.

Работа посвящена изучению химической и структурной модификации фиброина при переработке биополимерных композиций и выполнялась в соответствии с приоритетными направлениями развития науки, технологий и техники в Российской Федерации в рамках грантов Российского фонда фундаментальных исследований: проекты № 19-38-90325 и № 18-29-17059*мк*.

Объекты исследования – пленки, волокна, гидрогелевые материалы на основе фиброина и хитозана, способы их получения.

Предмет исследования – изучение фундаментальных закономерностей, лежащих в основе процессов получения материалов на основе сшитого хитозана и фиброина; закономерности получения широкопористых гидрогелей и волокнистых биоматериалов, определение перспектив их использования в качестве матриксов для тканевой инженерии.

Цель работы заключалась в разработке методов получения не растворимых в воде волокнистых и гидрогелевых материалов медико-биологического назначения путем переработки регенерированного фиброина.

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

- изучены условия перехода фиброина в β-конформацию в присутствии этанола и их влияние на процесс выделения фиброина из коконов шелкопряда Bombyx mori;

- изучена кинетика взаимодействия фиброина и природного сшивающего реагента дженипина;

- исследованы закономерности гелеобразования в растворах фиброина и его композиций с хитозаном в процессе сшивки дженипином;

- разработаны методы химической и структурной модификации биополимеров в процессе получения волокнистых и пленочных материалов и после формования биополимерных волокон и гидрогелей;

- разработаны не растворимые в воде биополимерные материалы на основе фиброина и его композиций с хитозаном: лекарственно-наполненные пленки, волокнистые материалы, и криоструктураты гидрогелей, исследованы их морфология и физико-химические свойства;

- изучены биосовместимость и перспективы использования разработанных материалов в качестве искусственных матриксов для тканевой инженерии и систем с контролируемым высвобождением лекарственных соединений.

Методы исследования и технические средства решения задач.

С целью определения физико-химических свойств растворов биополимеров применялись методы вибрационной и ротационной вискозиметрии. Фазовое разделение фиброин-хитозановых систем и систем, химически модифицированных дженипином, проводили с использованием кондуктометрии и вискозиметрии. Получение композиционных матриксов для тканевой инженерии осуществляли методом лиофильной сушки композиций и растворов фиброина и хитозана. Степень набухания биополимерных пленок и биодеградируемых матриксов изучали гравиметрическим методом. С применением метода атомно-силовой, оптической, конфокальной лазерной и сканирующей электронной микроскопии были изучены морфология волокнистых матриксов и пленок, а также распределение клеток при их культивировании. Получение мононитей из хитозана и его смесей с фиброином осуществляли при помощи коагуляционного формования. Получение нановолокнистых материалов на основе растворов фиброина проводилось методом бескапиллярного электроформования. Цитотоксичность биополимерных матриксов определяли с помощью метода тестирования экстрактов.

Исследования проводились на оборудовании кафедры химии и технологии полимерных материалов и нанокомпозитов и Центра коллективного пользования Российского государственного университета им. А.Н. Косыгина, спектральные исследования осуществлялись н.с. Свидченко Е.А. в Центре коллективного пользования «Центр исследования полимеров» ИСПМ им. Н.С. Ениколопова

РАН, криоструктураты получали под руководством д.х.н., проф. Лозинского В.И. в лаборатории криохимии биополимеров, ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН. Исследование цитотоксичности пористых гидрогелевых матриксов проводилось н.с. ИБХ РАН Дроздовой М.А. и в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

Научная новизна работы. Впервые:

1. Обоснованы способы перевода композиций хитозана и фиброина в не растворимое в воде состояние: конформационный переход в фиброине и химическая сшивка, и на этой основе предложены технологические решения в области формования волокон.

2. На примере пленок установлено, что обработка водно-этанольным раствором может служить эффективным средством перевода материалов на основе фиброина в не растворимую форму. Доказано, что в основе этого факта лежит конформационный переход фиброина в β-складчатую конформацию.

3. Установлены новые особенности механизма взаимодействия фиброина и хитозана с дженипином и гелеобразования в их растворах: продолжительный индукционный период роста вязкости и интенсивности поглощения при λ=610 нм, предшествующие образованию пространственной сетки сшитых биополимеров.

4. Обнаружено, что индукционный период реакции сшивки фиброина и хитозана (1:1) дженипином, детектируемый по стадии роста интенсивности синей окраски раствора, в 3 раза продолжительнее по сравнению с хитозаном, что создало возможность совместить процесс модификации и технологические операции формования не растворимого в воде волокна, пригодного для использования во влажной среде организма.

5. Установлена взаимосвязь состава формовочных композиций на основе растворов фиброина и хитозана, условий коагуляционного и электроформования мононитей и волокнистых материалов, условий перевода биополимеров в не растворимое состояние и растворимости, осмотических и физико-механических свойств пленок и волокон.

Теоретическая значимость. Установлена роль конформационных переходов фиброина и структурообразования в его смешанных растворах с хитозаном при формовании не растворимых в воде композиционных волокон и гидрогелей. Определены пути воздействия на продолжительность стадий модификации аминогрупп дженипином и образования сшитой пространственной сетки при получении биополимерных материалов из фиброина и хитозана.

Практическая значимость. Разработаны методы получения волокнистых и гидрогелевых материалов на основе фиброина и его смеси с хитозаном, перспективных для применения в качестве пористых биополимерных матриц для тканевой инженерии и систем с контролируемым высвобождением лекарственных соединений. Разработан способ получения биодеградируемых криоструктуратов с высокой влагоудерживающей способностью, регулируемым размером пор и скоростью биодеградации, и показана эффективность их

использования в качестве 3D-подложки в процессе культивирования животных клеток. Установлено, что введение фиброина приводит к подавлению воспалительной реакции тканей, усилению клеточной адгезии и пролиферации живых клеток на волокнистом материале из сшитого хитозана. Установлен пролонгирующий эффект иммобилизации биологически активных соединений в структуре сшитых биополимерных пленок из фиброина и хитозана, модифицированных дженипином.

На защиту выносится:

Новые особенности механизма взаимодействия аминосодержащих полимеров фиброина и хитозана с дженипином.

Технологические решения в области формования не растворимых в воде волокон, основанные на реализации перехода фиброина в β-конформацию и химической сшивке дженипином.

Новый подход к получению не растворимых в воде нитей, нетканых волокнистых и пленочных материалов на основе регенерированного фиброина и хитозана, позволяющий за счет использования в качестве сшивающего реагента дженипина реализовать процесс формования в условиях постоянной вязкости.

Апробация результатов. Результаты работы были изложены на ***международных научных конференциях***: 9th international conference “Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safetly-Toxicology and ecology issues” Bionanotox-2018, Crete, Greece, 06-13 may 2018; Международный форум биотехнология: состояние и перспективы развития, Biotech-2018, 23-25 мая 2018, Москва, Россия; Международная научно-техническая конференция «Дизайн, технологии и инновации в текстильной и легкой промышленности» (ИННОВАЦИИ–2018), 14-15 ноября 2018 г., Москва, Россия; Четырнадцатая Международная конференция «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (РосХит-2018), 17-23 сентября 2018 г., Севастополь, Россия; VII Всероссийская научная конференция (с международным участием) «Физикохимия полимеров и процессов их переработки», 16-20 сентября 2019 г., Иваново, Россия; XXII Международный научно-практический форум «SMARTEX – 2019», «Физика волокнистых материалов: структура, свойства, наукоёмкие технологии и материалы», 25 – 27 сентября 2019 г., Иваново, Россия; 10th international conference “Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safetly-Toxicology and ecology Issues” Bionanotox-2019, Crete, Greece, 05-12 may 2019; VIII международная конференция «Перспективные полимерные композиционные материалы. Альтернативные технологии. Переработка. Применение. Экология. («Композит-2019»)», 21-23 мая 2019 г., Энгельс, Россия; Международная научно-практическая конференция «Актуальные аспекты химической технологии биологически активных веществ» – 2020, 26 мая 2020 г., Москва, Россия; 11th international conference “Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safetly-Toxicology and ecology Issues” Bionanotox-2020, Webinar, 07-18 September 2020; 12th international conference “Biomaterials and

nanobiomaterials: Recent Advances Safetly-Toxicology and ecology issues" Bionanotox-2021, Crete, Greece, 27 sep. - 04 oct. 2021. ***Всероссийские научные конференции:*** Восьмая Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры в стратегии научно-технического развития РФ «Полимеры-2020», 9-13 ноября 2020 г., Москва, Россия; XXVI Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем (Яльчик-2020)», 17 – 21 августа 2020 г., Казань, Россия; РосХит-2021: Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана, Архангельск, 15 – 19 сентября 2021.

Публикации. Основные положения диссертационной работы опубликованы в **24** печатных работах, из них **7** работ опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК при Минобрнауки России, и **17** работ, опубликованных в материалах различных научных конференций.

Структура и объем работы. По своей структуре диссертационная работа состоит из введения, трех глав, выводов по работе и списка литературы. Работа изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит 64 рисунка, 16 таблиц. Список литературы включает 160 библиографических и электронных источника.

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 показаны особенности строения и переработки белка фиброина, способы перевода полимерных материалов на его основе в не растворимое в воде состояние и их применение в качестве материалов и гидрогелей медико-биологического назначения. **Во второй главе** (методическом разделе) описаны объекты исследования, методики формирования пленочных, волокнистых и гидрогелевых материалов на основе фиброина и его смесей с хитозаном. **В третьей главе** представлены результаты и их обсуждение.

Результаты и их обсуждение

Как показано в литературном обзоре, белок фиброин, также как аминосодержащий полисахарид хитозан является одними из наиболее перспективных биполимеров для применения в тканевой инженерии и разработки материалов медико-биологического назначения. Однако в отличие от хитозана, фиброин содержит мало реакционно-способных аминогрупп и химическая сшивка, которая лежит в основе получения не растворимых в воде материалов на основе биополимеров может быть недостаточно эффективной. В случае фиброина потеря растворимости в воде может происходить не только в результате химической сшивки, но и структурных перестроек при переходе в β-складчатую конформацию. С целью разработки методов получения не растворимых волокон, пленок и гидрогелей, были исследованы условия модификации фиброина, приводящие к потере им растворимости в воде: закономерности перехода в β-складчатую конформацию и химической сшивки

реагентом природного происхождения дженипином в растворах фиброина и его смесей с хитозаном.

Изучение условий перевода фиброина в β-складчатую конформацию.

Конформационные переходы от глобулы к α-конформации и β-структуре сопровождают процесс биосинтеза природного фиброина шелка, и могут происходить на разных стадиях получения материалов на основе фиброина . Проведена оптимизация процесса получения регенерированного фиброина, включают растворение коконов шелкопряда, в растворителях, разрушающих дисульфидные связи между фиброином и серицином и водородные связи, удаление примесей и олигопептидов диализом и лиофильную сушку разбавленного водного раствора фиброина. Определены оптимальные условия выделения фиброина из натурального шелка, обеспечивающие получение однофазных растворов, пригодных для формования пленок и волокон: понижение концентрации фиброина до 8-10 % и содержания этанола в растворе не более 30%, или использование в качестве электролита 9М водного раствора бромида лития. Обнаружен сложный характер концентрационной зависимости динамической вязкости, характеризующийся наличием участков с экспоненциальным ростом и слабой зависимости вязкости от концентрации (рис. 1), который не может быть обусловлен увеличением числа ионизующихся групп, так как электропроводность раствора изменяется монотонно, а pH не более, чем на 0,1 ед. при изменении концентрации на каждые 10%.

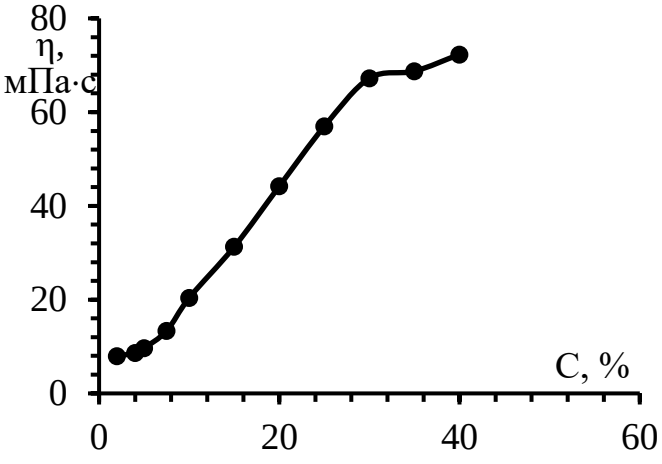


Рис. 1. Зависимость динамической вязкости от концентрации раствора фиброина.

Замедление роста вязкости после 30%-ной концентрации может быть связано с началом конформационных перестроек: переходом фиброина от глобулярной конформации, характерной для разбавленных растворов, к анизотропной конформации α-спирали и появлением β-складчатых структур. Это предположение подтверждается значительным увеличением мутности концентрированных растворов фиброина в этой концентрационной области.

Для переработки в волокно, пленку или иной гидрогелевый фиброин-содержащий материал из раствора, нужна глобулярная (растворимая) форма или конформация α-спирали, а после переработки необходимо осуществить или перевод фиброина в β-форму. Перевод в нерастворимую форму β-листа может быть обеспечен обработкой сформованных волокон из фиброина шелка метанолом или этанолом. Метанол является токсичным растворителем, поэтому

для контроля конформационного перехода в пленках из фиброина использовали этанол. Установлено, что видимый конформационный переход в растворе начинается при использовании 40%-го раствора этанола, а оптимальные условия для перераспределения межмолекулярных водородных связей, сопровождающие формирование β-листов, соответствуют 80%.

Была проведена идентификация конформационного перехода в пленках из фиброина. Были получены и исследованы Фурье ИК-спектры регенерированного фиброина (водорастворимая фракция) и не растворимой пленки, обработанной 80 %-ным раствором этанола в течение 1 часа (рис. 2).

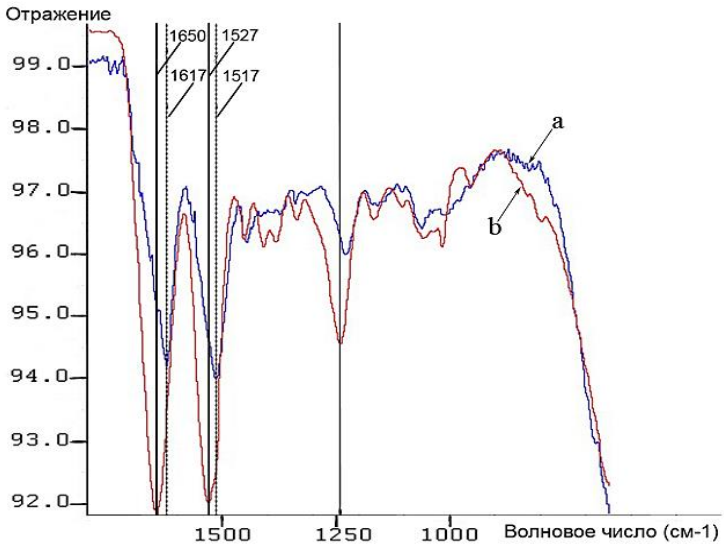


Рис. 2. ИК-Фурье спектры порошка регенерированного фиброина и пленки, обработанной этанолом (80%-ный раствор): a – пленка после обработки раствором этанола; b – исходный регенерированный фиброин.

Фиброин, обработанный этанолом (кривая а), показывает сдвиги и появление полос при 1617, 1517, 1220 $см^{-1}$, характерных для конформации β-листа. Эти изменения соответствуют литературным данным и указывают на преобразование в упорядоченный лист при обработке водным раствором этанола. Характерным является наличие оптимальной концентрации этанола, вызывающей это преобразование. Фактически, вода может действовать как агент набухания по отношению к компактному и плотному фиброину шелка, тем самым способствуя разрыхлению матрицы полимера, проникновению этанола и перестройкам меж- и внутримолекулярных водородных связей.

Таким образом, установлено, что обработка водно-этанольным раствором может служить эффективным средством перевода материалов на основе фиброина в не растворимую форму. Доказано, что в основе этого факта лежит конформационный переход фиброина в β-складчатую конформацию.

Изучение процесса сшивки фиброина бифункциональным реагентом.

Перспективным способом получения не растворимых в воде материалов на основе аминосодержащих биополимеров является химическая сшивка. Химическая сшивка позволяет осуществить необратимый переход от раствора водорастворимого биополимера к его гидрогелю, и этот прием используется при получении и регулировании свойств различных типов биоматериалов.

Проведены сравнительные исследования кинетики гелеобразования в растворах фиброина и хитозана (рис. 3). Как видно из полученных данных, время

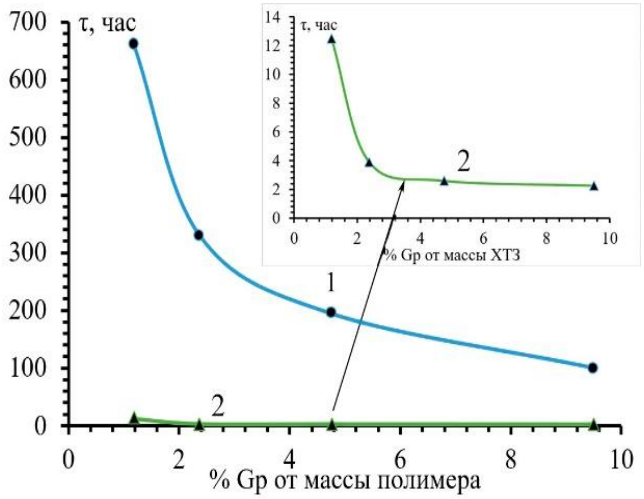


Рис. 3. Зависимость времени гелеобразования в 2%-ном растворе фиброина pH 7,3 (1) и хитозана pH 5,6 (2) в процессе сшивки дженипином от содержания сшивающего реагента.

гелеобразования в 2%-ном растворе фиброина даже при высоком содержании дженипина и pH 7,2 на порядки выше, чем в эквиконцентрированном растворе хитозана и составляет несколько суток. Это связано с низким содержанием первичных аминогрупп в молекуле фиброина.

Спектроскопическое исследование реакции сшивки фиброина дженипином.

Добавление раствора дженипина к раствору фиброина приводит к появлению или изменению полос поглощения в нескольких диапазонах видимой и ультрафиолетовой областей спектра (240, 287, 360 и 610 нм), соответствующих поглощению гетероцикла дженипина, длинноволновому переходу хромофора, образующегося при внедрении азота аминогруппы в гетероцикл дженипина (первичная реакция) и олигомерным формам дженипина, содержащим сопряженные связи (610 нм). Это позволяет исследовать влияние условий сшивки на разные стадии реакции взаимодействия фиброина с дженипином.

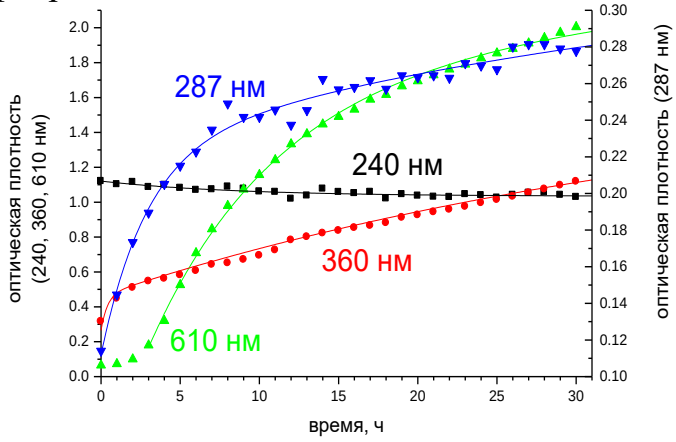


Рис. 4. Кинетические зависимости интенсивности характеристических полос поглощения в растворе фиброина в процессе реакции с дженипином.

Представленные данные по динамике роста полос (рис. 4) показывают, что происходящие изменения аналогичны обнаруженным ранее изменениям в спектре продуктов реакции дженипина с хитозаном. Первичная реакция активно протекает в течение 10-ти часов, затем замедляется. Она сопровождается расходованием дженипина. Вторичная реакция, которая завершает процесс, начинается после образования достаточного количества продуктов первичной реакции (примерно через 4 ч) и протекает с высокой скоростью до 10 ч, после чего продолжается с меньшей скоростью в течение всего времени наблюдения.

Таким образом, установлено образование продуктов взаимодействия Gp с первичными аминогруппами фиброина, поглощающими электромагнитное

излучение в тех же областях, что и продукты реакции Gp с хитозаном, однако скорость гелеобразования в растворах фиброина значительно ниже, чем в растворах хитозана. Этот факт накладывает определенные ограничения на возможность и условия получения не растворимых в воде материалов на основе фиброина.

Получение не растворимых в воде материалов из растворов фиброина

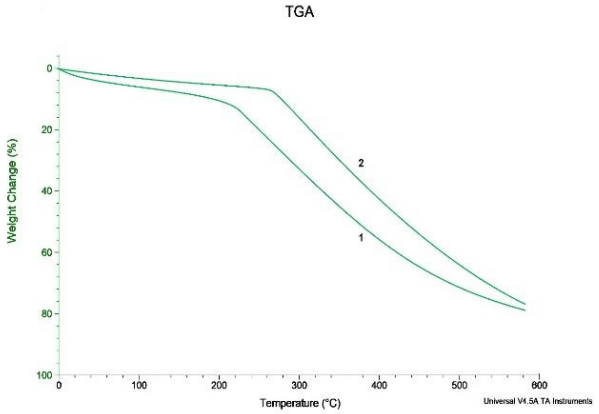


Рис. 5. Термограмма волокнистого материала из фиброина: 1 – без модификации; 2 – модифицированного 80%-ным этанолом.

Получение волокнистых материалов из фиброина методом электроформования. Растворы с концентрацией 10-30% были использованы для получения волокнистых материалов методом электроформования. Готовые волокна для перевода в нерастворимое состояние обрабатывали этанолом в условиях, приводящих к переходу в β-конформацию.

На рис. 5 представлена термограмма волокнистых материалов из фиброина и фиброина, обработанного этанолом. Обработанные этанолом волокна теряют массу медленнее, и деструкция начинается при более высокой температуре. Это объясняется повышенным содержанием β-складчатых структур в волокнистой матрице модифицированного образца, индуцированных обработкой в спирте.

Для определения физико-механических характеристик полученных материалов был разработан метод оценки адгезионной прочности элементарного волокна методом АСМ. С использованием кантилевера с повышенным коэффициентом жесткости и приставки для визуализации отдельно взятого волокна была реализована возможность измерения напряжения и деформации на отдельных волокнах. Полученные результаты позволяют проследить влияние концентрации формовочного раствора на физико-механические свойства волокон из фиброина (табл. 1), а в дальнейшем и его смесей с хитозаном.

Таблица 1 – Свойства волокнистых материалов из фиброина, полученных электроформованием.

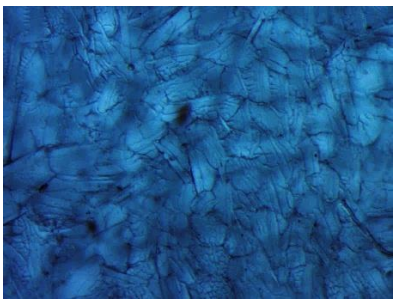
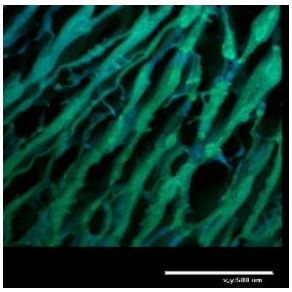
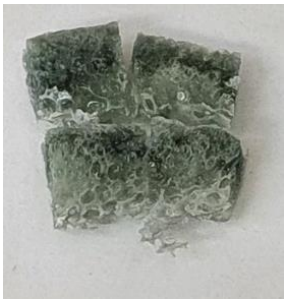
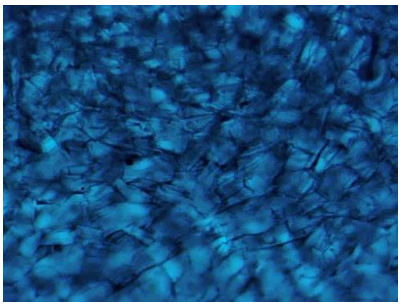
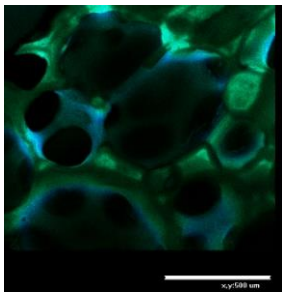
№ п/п	Концентрация раствора фиброина, %	Характеристики волокна			Характеристики материала	
		D волокон, мкм	Разрывное усилие, у.е.	Разрывное напряжение, кПа	Паропроницаемость, мг/(см^2*ч)	Гигроскопичность, %
1	10	1,05±0,10	159,3	1,84	2,8	6,4
2	20	2,80±0,20	255,2	0,41	2,9	6,2
3	30	4,20±0,21	316,5	0,23	4,1	6,0

Увеличение концентрации раствора привело к получению более толстых и менее прочных волокон, обладающих паропроницаемостью и гигроскопичностью около 6%.

Получение сшитых дженипином широкопористых криоструктуратов из растворов фиброина. Для получения пористых материалов на основе фиброина был использован способ, при котором сшивку дженипином проводили уже сформированных лиофильной сушкой водных растворов фиброина пористых материалов, причем сшивающий реагент использовали в виде раствора в этаноле. Согласно этому способу получали растворы фиброина с концентрацией 10 и 20%, которые разливали в чашки Петри и выдерживали при температуре -10°С в течение тридцати минут и лиофильно сушили 18 часов. Высушенные таким образом образцы, которые представляли собой легкие пористые пластинки, погружали в 10%-ый раствор дженипина в этаноле на 24 часа. Таким образом, получались сшитые дженипином криоструктураты.

Поверхность и внутренняя структура полученных матриксов была исследована методами оптической и конфокальной лазерной микроскопии. Результаты исследования свидетельствуют о том, что полученные материалы обладают системой взаимопроникающих пор, размер которых можно изменять, меняя концентрацию раствора хитозана (табл. 2).

Таблица 2 – Морфология поверхности криоструктуратов фиброина, сшитых дженипином.

Концентрация раствора фиброина	Внешний вид образца	Оптическая микроскопия поверхности	Конфокальная микроскопия
20			
30			

Полученные криоструктураты не растворялись в воде. Отсутствие растворимости обеспечивалось как переводом фиброина в β-конформацию, так и химической сшивкой дженипином, которая протекала в среде этанола.

Изучение полимерных систем на основе растворов фиброина и хитозана

Полученные из полисахаридов и белков волокнистые материалы, имитируют естественную среду организма и таким образом обеспечивают оптимальные условия для роста и регенерации тканей. Увеличение числа аминогрупп в растворе окажет влияние на закономерности и кинетику взаимодействия с дженипином. Для получения полимерных материалов на основе хитозана и фиброина путем растворения фиброина в растворах хитозана в 2%-ной уксусной кислоте были приготовлены смешанные растворы биополимеров в общем растворителе.

Спектральные и реологические исследования кинетики гелеобразования и сшивки в смешанных растворах хитозана и фиброина. С целью установления особенностей реакции сшивки хитозана и фиброина в их совместных растворах по сравнению с растворами индивидуальных аминосодержащих полимеров была исследована кинетика изменения электронных спектров поглощения и вязкости реакционных смесей с разным содержанием фиброина в присутствии дженипина (соотношение хитозан-фиброин ХТЗ/ФБ 2:1 и 1:1) (Рис. 6).

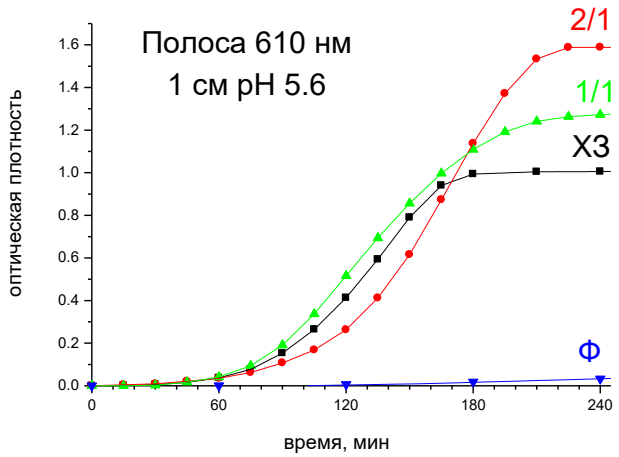


Рис. 6. Кинетика изменения интенсивности основных полос поглощения в процессе сшивки дженипином.

Обнаружено что увеличение полосы 610 нм в растворе имеет несколько участков: отсутствия роста, малой скорости (за счет накопление первичных продуктов присоединения) и почти линейного роста оптической плотности. Показано, что индукционный период реакции сшивки фиброина, детектируемый по стадии роста интенсивности синего цвета, реакции сшивки составил 5 часов, что в 3 раза превышает продолжительность первой стадии реакции с хитозаном (в аналогичных условиях проведения). Установленная возможность управлять индукционным периодом путем изменения композиционного состава позволила регулировать время структурирования и гелеобразования (Рис. 7) в формовочных растворах при получении волокон и пленок, содержащих аминосодержащие полимеры.

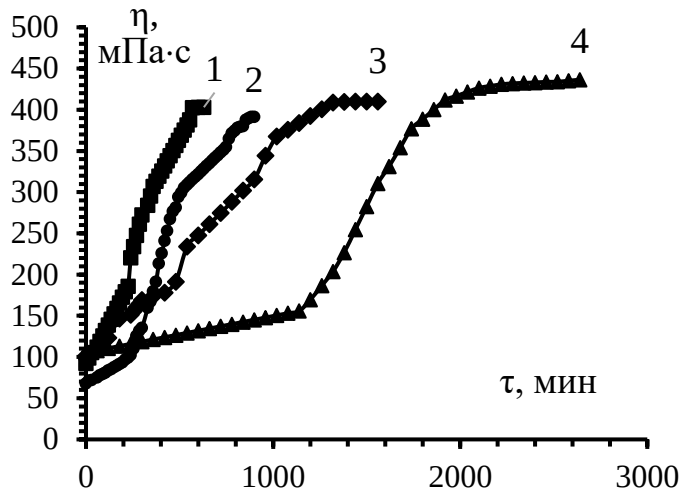


Рис. 7. Кинетика гелеобразования в 2% растворах хитозана и хитозана с фиброином (1:1), 1 – хитозан, соотношение Дж/NH2 0,08 моль/моль; 2 – хитозан/фиброин (1:1), Дж/NH2 0,08 моль/моль; 3 – хитозан, 0,02 моль/моль; 4 – хитозан/фиброин (1:1), 0,02 моль/моль.

Проведенные исследования определяют перспективы модификации волокнообразующих полимеров в формовочном растворе, которые обеспечивают продолжительный период постоянной вязкости (рис. 7), что позволит сохранить их способность к пленко- или волокнообразованию в электрическом или силовом поле, но формируют после завершения реакции сшивки устойчивость полимерного материала к водной среде.

Разработка биополимерных материалов на основе хитозана и фиброина.

Получение биополимерных пленок, волокон или гидрогелей из смесей фиброина с хитозаном позволяет сочетать известные структурные характеристикам фиброина шелка и биосовместимость хитозана. полимерные системы на основе растворов фиброина и хитозана были использованы для получения биологически активных пленок, пористых криоструктуратов, полученных электроформованием нетканых волокнистых материалов и моноволокон, сформованных по «мокрому способу» путем коагуляции в осадительной ванне. Состав формовочных композиций на основе растворов хитозана и фиброина определяли с учетом продолжительности индукционного периода роста вязкости, необходимого для завершения технологических операций подготовки к формованию (фильтрация, обезвоздушивание). Индикатором готовности композиции к формованию было появление светло-зеленого окрашивания, свидетельствующего о начале второй стадии реакции с дженипином. Кроме того, на примере пленок изучено влияние состава формовочного раствора и содержания в нем дженипина на растворимость, степень набухания и фармакодинамические свойства биологически активных материалов из фиброина и хитозана.

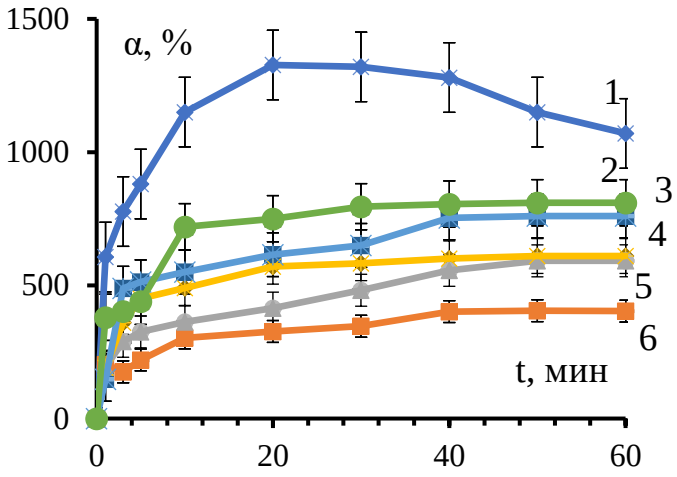


Рис. 8. Зависимость степени набухания от времени сшитых пленок из хитозана и фиброина 1:1 с соотношением сшивающего реагента/-NH2: 1 – 0; 2 – 0,003; 3 – 0,005; 4 – 0,01; 5 – 0,02; 6 – 0,04 моль/моль.

Влияние сшивки дженипином на свойства пленок из хитозана и фиброина. Из данных рисунка 8, видно, что скорость набухания, а также максимальная степень набухания, увеличивается при уменьшении содержания сшивающего реагента. Характер кинетических кривых набухания образцов, полученных из растворов, содержащих фиброин, имеет вид кривых с насыщением. Это, наряду с минимальной растворимостью сшитых пленок, свидетельствует о включении фиброина в трехмерную сетку сшитого хитозана.

При высоком содержании сшивающего реагента скорость реакции сшивки превышает скорость испарения растворителя, в результате фиксируется неравновесная укладка полимерных цепей. Из данных таблицы 3 видно, что с увеличением содержания сшивающего реагента напряжение, возникающее при разрыве пленки, уменьшается. Изменение содержания сшивающего реагента может служить эффективным инструментом управления влагопоглощением и фармакодинамическими свойствами биополимерного материала на основе фиброина и хитозана (табл. 3).

Таблица 3 – Свойства биологически активных пленок из хитозана и фиброина (1:1) с различным соотношением сшивающего реагента.

Содержание сшивающего реагента, %	Толщина пленки, мкм	Разрывное напряжение, МПа	Разрывное удлинение, %	% высвобождения мирамистина (за 100 мин)
0	50	1,43	16	100
0,34	50	0,783	12	74
0,68	50	0,344	16	60
1,36	50	0,198	12	41

Изучение процесса электроформования и модификации волокнистых материалов на основе фиброина и хитозана. На основании изучения электропроводности и вязкости растворов были определены условия получения фиброин-содержащих волокон методом электроформования на установке Nanospider из растворов с концентрацией 10 и 20%.

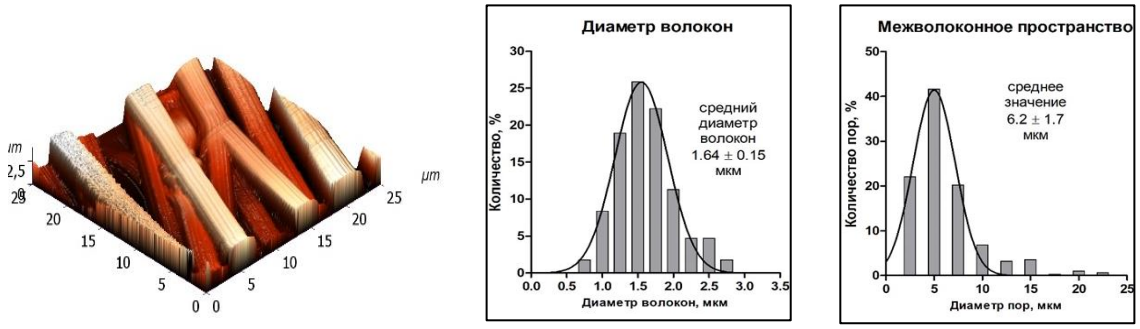
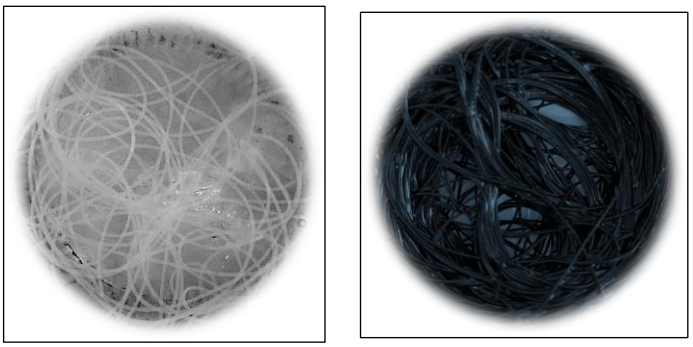


Рис. 9. Конфокальная микрофотография (шкала 100 мкм), АСМ 3Д изображение и распределение по диаметру волокон и по межволоконному пространству образца субмикроволокна, полученного из 10%-го раствора фиброина, содержащего хитозан при соотношении 10:1.

Для определения среднего диаметра волокон и размера межволоконного пространства были использованы фотографии, полученные с помощью конфокальной микроскопии (рис. 9). Структура материала представляла собой волокна со средним диаметром 1,64 ± 0.15 мкм и межволоконным расстоянием 6,2 ± 1.7 мкм. Стабилизация структуры волокон достигалась за счет обработки этанолом и введения в состав формовочной композиции дженипина.

Получение монофиламентной нити из формовочных растворов на основе хитозана и фиброина. При формовании нити по «мокрому» способу, то есть методом коагуляции в осадительной ванне, образование твердой нити происходит в результате массообменных процессов. В качестве осадителей были исследованы смешивающиеся с водой органические растворители и выбран этанол и 10% раствор NaOH (1:1). NaOH нейтрализует уксусную кислоту и депротонирует аминогруппы хитозана. Этанол дегидратирует хитозан и вызывает конформационные переходы в фиброине, приводящие к снижению его растворимости. Монофиламентные нити из чистого хитозана и смеси хитозана и фиброина при соотношении 1:1 были получены на формовочной установке МУЛ-1 через фильеру с отверстием диаметром 0,6 мм. На рис. 10 представлены фотографии волокон были получены с помощью оптического микроскопа. Моноволокна, полученные в присутствии сшивающего реагента, имели выраженную темно-синюю окраску, характерную для продукта взаимодействия хитозана с дженипином.



а б

Рис. 10 – Нити из хитозана (ММ 200 кДа) с фиброином: а – без химической модификации, б – химически сшитые дженипином.

Получение криоструктуратов из растворов хитозана и его смесей с фиброином. Криоструктураты получали в описанных ранее условиях. Сшивку хитозана дженипином проводили в среде этанола после приготовления

криоструктуратов. На рис. 11 приведены микрофотографии образцов, а также 3D реконструкция их пористой структуры и распределение пор по размерам.

Разработанные волокнистые материалы и криоструктураты на основе формовочных композиций с разным содержанием дженипина, обладающие высокой влагоудерживающей способностью, регулируемым размером пор и скоростью биодеградации, были опробированы в тестах на цитотоксичность и в качестве 3D-подложки в процессе культивирования животных клеток, изучены их имуномоделирующие свойства и влияние на исход местной воспалительной реакции при подкожном введении лабораторным животным. Полученные результаты свидетельствуют о значимой степени активации анализируемой популяции клеток после контакта с волокнистым субстратом, при этом наибольшей биологической активностью обладали материалы, в составе которых соотношение фиброин/хитозан – 1:1. Установлено, что в случае использования мезенхимальных стволовых клеток уже через 3 дня культивирования на фиброинсодержащих материалах формируется живая ткань.

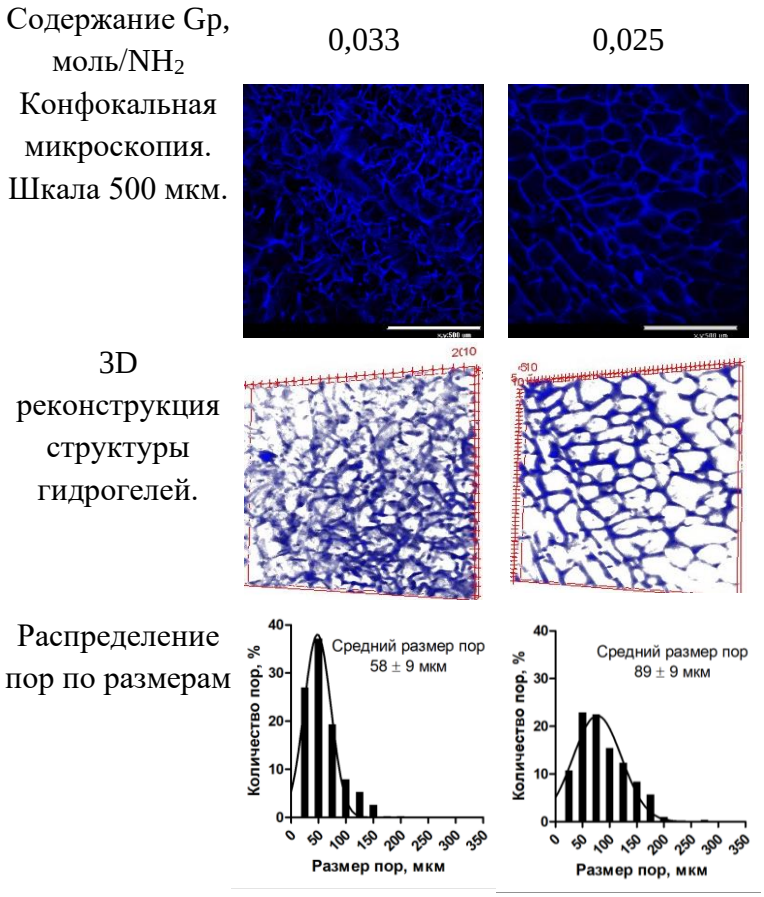


Рис. 11. Морфология хитозановых криоструктуратов, сшитых дженипином

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ ПО РАБОТЕ

1. Разработаны методы химической и структурной модификации фиброина при получении не растворимых в воде биодеградируемых волокнистых и гидрогелевых материалов.

2. Разработаны методы получения не растворимых в воде волокнистых и гидрогелевых материалов путем переработки формовочных композиций на основе растворов регенерированного фиброина, хитозана и сшивающего реагента, перспективных для применения в качестве пористых биополимерных матриц для тканевой инженерии и систем с контролируемым высвобождением лекарственных соединений.

3. Определена роль конформационных переходов фиброина при определении условий его дегуммирования и формовании не растворимых в воде волокон и гидрогелей.

4. Установлены закономерности процесса сшивки и гелеобразования в смешанных растворах хитозана и фиброина в присутствии природного сшивающего реагента дженипина, показано, что макромолекулы белка включаются в пространственную сетку геля.

5. С использованием флуоресцентной метки установлены особенности пролонгированного высвобождения из гидрогелевых материалов иммобилизованного комплекса противовоспалительных и антибактериальных пептидов и белков, секретируемых стволовыми клетками. Установлено, что изменение концентрации дженипина позволяет регулировать фармако-кинетические свойства хитозан-фиброиновых пленок.

4. Разработан способ получения модифицированных широкопористых криоструктуратов хитозана и его композиций с фиброином.

5. В опытах in vitro показаны биосовместимость и отсутствие цитотоксичности разработанных пленок и нановолокнистых материалов. Установлена способность фиброин-содержащих волокон поддерживать трехмерный рост мышиных фибробластов и стволовых мезенхимальные клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и входящих в международные базы цитирования Scopus и Web of Science:

1. **Сажнев Н.А.**, Дроздова М.Г., Родионов И.А., Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И., и др. Получение криоструктуратов хитозана с регулируемой пористой морфологией и их использование в качестве 3D-подложек для культивирования животных клеток // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2018. – Т. 54. – № 5. – С. 455-464. (Applied Biochemistry and Microbiology. – 2018. – V. 54. – № 5. – P. 459–467).

2. Балабанова Т.В., Дроздова М.Г., Демина Т.С., **Сажнев Н.А.**, Кильдеева Н.Р., и др. Биодеградируемые макропористые матриксы на основе хитозана и его сополимеров с олиголактидами для регенеративной медицины // *Гены&Клетки*. – 2019. – Т.14. – С.33-34.

3. Vasilenko I.. Kil'deeva N,, Metelin V., **Sazhnev N.**, Zakharova V., et al. The potential of laser interferometry for a non-invasive assessment of biopolymer film structure and biological properties // *Proc. of SPIE*. – 2019. – V. 11076. – P. 110761-110764.

4. Kildeeva N., Chalykh A., Belokon M., Petrova T., Matveev V., Svidchenko E., Surin N., **Sazhnev N**. Influence of Genipin Crosslinking on the Properties of Chitosan-Based Films // *Polymers*. – 2020. – V. 12. – № 5. – P. 1086.

5. **Сажнев Н.А.**, Гридина Н.Н., Кильдеева Н.Р. Изучение свойств биологически активных пленок из хитозана, содержащих анестезирующее вещество // *Химические волокна.* – 2019. – Т. 6 – С. 14-18. (Fibre Chemistry – 2020. – V. 52. – № 6. – P. 394-399).

6. **Сажнев Н.А.**, Кильдеева Н.Р., Дроздова М.Г., Марквичева М.А. Получение волокнистых матриц для тканевой инженерии методом электроформования из фиброинсодержащих растворов // *Химические волокна.* – 2021. – Т. 6. – С. 6-9.

7. **Sazhnev N.**, Zakharova V., Kildeeva N. Study of drug release from tissue materials treated with chitosan // *AIP Conference Proceedings*. – 2022. – V. 2430. – С. 080004.

Публикации в других изданиях и материалах конференций*:*

8. **Сажнев Н.А.**, Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И. Получение пленок и высокопористых полимерных матриц на основе хитозана, модифицированного химической сшивкой // Международный форум: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни. – 2018. – С. 295-297

9. **Сажнев Н.А.**, Кильдеева Н.Р. Изучение фармакодинамических свойств биологически активных полимерных композиций // «Дизайн, технологии и инновации в текстильной и легкой промышленности» (Инновации-2018): сборник материалов Международной научно-технической конференции. Часть 2. – 2018. – С. 127-129.

10. **Sazhnev N.A.**, Drozdova M.G., Kildeeva N.R., Marvicheva E.A., Lozinsky V.I. Preparation of 3D-scaffolds based on chitosan modified by chemical cross-linking // Bionanotox. 9th international conference “Biomaterials and nanobiomaterials”. – 2018. – P. 41.

11. Balabanova T., Salnikova A., Drozdova M., **Sazhnev N.**, Kildeeva N., et. al Chitosan-based scaffolds for tissue engineering: preparation and in vitro evalation // Bionanotox. 10th international conference “Biomaterials and nanobiomaterials”. – 2019. – P. 30.

12. **Сажнев Н.А.**, Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И. Получение пористых гидрогелей сшитого хитозана для использования в регенеративной медицине // VII Всероссийская научная конференция (с международным участием) «Физикохимия полимеров и процессов их переработки» - 2019. – С. 187-188.

13. **Сажнев Н.А.**, Губочкина А.А., Кильдеева Н.Р. Электроформование и химическая модификация волокон из хитозана // VIII международная конференция «Композит-2019». – 2019. – С. 151-155.

14. Захарова В.А., Василенко И.А., Метелин И.Б., **Сажнев Н.А.**, Кильдеева Н.Р. Исследование поверхности биополимерных хитозановых матриц и волокон методом интерференционной лазерной микроскопии // Сборник Материалов XXII Международного научно-практического форума «SMARTEX – 2019». – 2019. – С. 30-34.

15. Kildeeva N.R., **Sazhnev N.A.**, Zakharova V.A., Gubochkina A.A.. Biologically active films and fibers based on chitosan cross-linked by genipin // Binanotox. 11-th international conference. – 2020. – P. 24.

16. **Сажнев Н.А.**, Кильдеева Н.Р. Изучение фармакодинамических свойств биологически активных полимерных композиций // сб. трудов международной научно-практической конференции «Актуальные аспекты химической технологии биологически активных веществ». – 2020. – Т. 191. – С. 99-100.

17. Захарова В.А., Василенко И.А., Метелин В.Б., **Сажнев Н.А.**, Кильдеева Н.Р. Изучение влияния биополимерных хитозановых волокнистых и пленочных материалов на морфофункциональное состояние живых циотообъектов // Восьмая всероссийская каргинская конференция «Полимеры — 2020». – 2020. – С. 371.

18. Толстова Т.В., Дроздова М.Г., **Сажнев Н.А.**, Кильдеева Н.Р. Биодеградируемые матриксы на основе хитозана для регенеративной медицины // XXXII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – 2020. – С. 33.

19. **Сажнев Н.А.**, Губочкина А.А., Свидченко Е.А., Сурин Н.М., Кильдеева Н.Р. Получение и химическая сшивка волокон из хитозана // Международная научно-техническая конференция «Дизайн, технологии и инновации в текстильной и легкой промышленности» (Инновации – 2020). – 2020. – С. 141-144.

20. Захарова В.А., **Сажнев Н.А.**, Кильдеева Н.Р., Василенко И.А., Метелин В.Б. Сравнительный анализ атомно-силовой и интерференционной лазерной микроскопии при исследовании наноразмерных тканеинженерных конструкций // XXVI Всероссийская Конференция «Структура и динамика молекулярных систем. ЯЛЬЧИК–2020». – 2020. – С. 73.

21. **Сажнев Н.А.**, Губочкина А.А., Железняк А.А., Кильдеева Н.Р. Получение и исследование свойств пленок из хитозана и фиброина, полученных с использованием природного сшивающего реагента // Всероссийская научная конференция молодых исследователей с международным участием «ИНТЕКС-2021». – 2021. – С. 175-178.

22. Журина М.С., **Сажнев Н.А.**, Кильдеева Н.Р. Использование изотиоцианата флуоресцеина для визуализации аминосодержащих биополимеров // Всероссийская научная конференция молодых исследователей с международным участием «ИНТЕКС-2021». – 2021. – С. 191-193.

23. Kildeeva N.R., Vasilenko I.A., Zakhsarova V.A., **Sazhnev N.A**. Study of the influence of the surface of biopolymer chitosan fibrous and film materials on the morphofunctional state of cells // Public Health Toxicology. – 2021. – V. 1. – A.16.

24. **Сажнев Н.А.**, Захарова В.А., Кильдеева Н.Р. Материалы из композиций фиброина и хитозана // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Материалы Пятнадцатой Общероссийской конференции с международным участием. – 2021. – С. 44.