

На правах рукописи



Апрятинна Кристина Викторовна

**ПОЛИМЕРНЫЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

02.00.06 – высокомолекулярные соединения
(химические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Нижний Новгород – 2018

Работа выполнена на кафедре высокомолекулярных соединений и коллоидной химии химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Научный руководитель: Доктор химических наук, профессор
Смирнова Лариса Александровна

Официальные оппоненты: **Кильдеева Наталия Рустемовна**,
доктор химических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Российский государственный университет
им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)»,
заведующая кафедрой химии и технологии
полимерных материалов и нанокompозитов

Липатова Ирина Михайловна,
доктор химических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт химии растворов им. Г.А. Крестова
Российской академии наук,
главный научный сотрудник лаборатории химии и
технологии модифицированных волокнистых
материалов

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт высокомолекулярных соединений
Российской академии наук

Защита диссертации состоится «10» октября 2018 года в 14⁰⁰ часов на заседании объединенного диссертационного совета Д 999.130.02 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н. И. Лобачевского и Институте металлоорганической химии им. Г. А. Разуваева по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться на сайте <https://diss.unn.ru/files/2018/839/diss-Apryatina-839.pdf> и в библиотеке Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского.

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, корп. 2, химический факультет, Гуцин А.В., gushchin4@yandex.ru.

Автореферат разослан "___" _____ 2018 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук, профессор



А.В. Гуцин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время хитозан (ХТЗ) – продукт деацетилирования природного полимера хитина находит все большее применение в различных областях биотехнологии, медицины, фармации и промышленности. Это связано, в первую очередь, с доступностью и возобновляемостью сырьевых источников, а также уникальными свойствами этого полисахарида – биоразлагаемостью, биосовместимостью, растворимостью в водных растворах кислот, высокими сорбционными свойствами, обусловленными наличием amino- и гидроксильных функциональных групп.

Несмотря на многочисленные исследования свойств ХТЗ и его производных и определенные успехи по внедрению научных разработок в практику, особенно в области космецевтики и фармацевтики, остаются задачи, требующие доработки и развития. Среди них – получение на основе ХТЗ материалов с заданными характеристиками, хорошими физико-механическими показателями и высокой гемостатической активностью. Один из путей их решения - блок- и привитая сополимеризация ХТЗ с биосовместимыми синтетическими полимерами. В этой области исследований остается открытым вопрос о влиянии на синтез гибридных продуктов конформационного состояния макромолекул ХТЗ, получении на основе сополимеров разнообразных форм кровоостанавливающих и ранозаживляющих средств, а также о придании полученным композициям бактерицидности. В свете реализации последнего перспективно использование наночастиц (НЧ) серебра с контролируемыми размерами, полученными в матрице полимера простым одностадийным «green» методом, и изучение свойств нанокомпозитов в водных дисперсиях и в конденсированном состоянии. В этом направлении отсутствуют данные о взаимном влиянии полимера-стабилизатора и НЧ, которые откроют возможности направленного изменения характеристик материала, углубленного понимания влияния структуры нанокомпозита на его свойства, а соответственно и на свойства разрабатываемых кровоостанавливающих и ранозаживляющих материалов.

Степень разработанности темы исследования. За последние два десятилетия достигнут прогресс в разработке нового поколения узконаправленных местных гемостатических агентов на основе ХТЗ, из которых наиболее распространенными являются - «CeloxTM» и «HemCon ChitoGauze PRO». Несмотря на свои положительные свойства – кровоостанавливающее действие, биосовместимость и гипоаллергенность, они обладают рядом недостатков - порошковая форма препаратов разогревается в ране и трудно из нее извлекается, не достигается полное закрытие раны, они не обладают дополнительным регенеративным эффектом и не получили в нашей стране массового распространения вследствие своей дороговизны. В связи с этим, остается актуальной проблема создания доступного атравматичного биосовместимого средства, обладающего быстрым гемостатическим действием как при венозных, так и при артериальных кровотечениях, бактерицидной активностью и ускоряющем регенерацию раневой поверхности.

Целью работы является модификация ХТЗ путем привитой и блок-полимеризации с 2-гидроксиэтилметакрилатом (ГЭМА) и N-винилпирролидоном (ВП); комплексное исследование физико-механических, структурных, теплофизических, биологических свойств композиций на основе ХТЗ, содержащих

ионы кальция и НЧ серебра; разработка кровоостанавливающих материалов на их основе с эффективными ранозаживляющими и бактерицидными свойствами.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- Комплексное исследование конформационных переходов макромолекул ХТЗ в растворах.
- Модификация ХТЗ путем привитой и блок-полимеризации с ГЭМА и ВП, влияние на процесс конформационного состояния макромолекул ХТЗ.
- Разработка композиций на основе различных солевых форм ХТЗ, комплексносвязанного с ионами кальция, и исследование их кровоостанавливающих свойств в опытах in vitro и in vivo.
- Получение кровоостанавливающих и ранозаживляющих материалов в виде гелей, пленок и губок на основе модифицированного ХТЗ.
- Изучение кинетики формирования НЧ серебра путем УФ-индуцированного восстановления ионов серебра в растворах ХТЗ. Исследование влияния конформационного состояния и молекулярной массы (ММ) макромолекул ХТЗ на размеры НЧ, и НЧ на размерные характеристики макромолекул ХТЗ в дисперсиях и физико-механические свойства композитов.
- Исследование бактерицидных свойств композиций, содержащих НЧ серебра.

Научная новизна. Установлена рН- и термочувствительность конформационных переходов клубок-спираль и спираль-глобула макромолекул ХТЗ спектрофотометрическим методом. Выявлена зависимость размерных характеристик макромолекул ХТЗ от их конформационного состояния. Макромолекулы ХТЗ в спиральных конформациях имеют больший размер, чем в конформациях клубка, что обуславливает различие вязкостных свойств растворов при одинаковой концентрации полимера. В области комнатных температур значения вязкости отличаются в ~1,5 раза и нивелируются с ростом температуры.

Глубина превращения мономеров, степень и эффективность привитой полимеризации ГЭМА и ВП на ХТЗ зависят от конформационного состояния его макромолекул. Выход целевого продукта – привитого сополимера (~98%) существенно выше при проведении процесса в растворах ХТЗ, когда его макромолекулы находятся в конформации клубка. Получены блок-сополимеры ХТЗ-ПВП, способные к биodeградации в организме без негативных последствий.

Впервые выявлено взаимное влияние НЧ серебра и стабилизатора-ХТЗ на их размерные характеристики: размер НЧ серебра уменьшается с увеличением ММ ХТЗ; формирование НЧ серебра в матрице ХТЗ существенно снижает средний диаметр его макромолекул. НЧ серебра повышают физико-механические свойства композиций на основе ХТЗ и смещают температуры стеклования и начала деструкции композита в область более низких значений.

Практическая значимость работы.

Разработано универсальное кровоостанавливающее средство на основе ХТЗ, комплексносвязанного с ионами кальция, останавливающее кровотечения различного характера в течение 25-40 с, ускоряющее эпителизацию раневой поверхности и обладающее высоким бактерицидным эффектом. Кровоостанавливающее средство выполнено в различных модификациях – гель, пленка, губка (Патент RU 2545991, евразийский патент № 026104).

Введение в состав композиции НЧ серебра предотвращает развитие воспалительных процессов и гнойных инфекций на раневой поверхности. Средство

эффективно для остановки кровотечений при оказании экстренной медицинской помощи, самопомощи и при хирургических операциях, а также для регенерации ткани при пересадке кожи, ожогах, пролежнях и язвах. Композиция ускоряет заживление раневой поверхности более чем в два раза по сравнению с естественной регенерацией.

В процессе доклинических испытаний скорректирована и отработана рецептура базовой композиции на основе модифицированного ХТЗ, комплексно связанного с ионами кальция в виде геля, применяемая не только при наружных, но и при внутренних кровотечениях, обеспечивающая пролонгированную биоутилизацию в организме без негативных последствий.

Объекты и методы исследования. ХТЗ - поли((1,4)-2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкоза, полученный из панцирей краба (ОАО «Биопрогресс», г. Москва, Россия) растворяли в водных растворах уксусной, соляной, янтарной, L-аспарагиновой, никотиновой, бензойной, молочной, аскорбиновой кислот. Вязкостные свойства растворов ХТЗ исследованы методом ротационной вискозиметрии на приборе Brookfield DV-II+ Pro. Конформационные переходы макромолекул ХТЗ устанавливали на спектрофотометре «SHIMADZU» (модель UV-1650pc). ХТЗ модифицировали привитой сополимеризацией с ГЭМА и ВП с инициаторами процесса - сульфата церия (IV), хлорида гексаамминкобальта (III), гексанитрокобальтата (III) натрия, и блок-сополимеризацией с ПВП путем ультразвуковой (УЗ) обработки смеси соответствующих гомополимеров. Ферментативное разложение цепей ХТЗ при расшифровке структуры цепей блок-сополимера проводили амилазой и папаином. Глубину превращения мономеров ГЭМА и ВП в процессе привитой полимеризации исследовали на газовом хроматографе GCMS-QP2010, Shimadzu. Образование блок-сополимеров доказывали методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы Shimadzu CTO20A/20AC. Кровоостанавливающие композиции получали на основе ХТЗ и его модифицированных форм, комплексно связанных с ионами кальция. В качестве источников ионов использовали - хлорид, глюконат и глицерофосфат кальция. Взаимодействие ХТЗ с белковыми молекулами изучали спектрофотометрическим методом, используя сывороточный альбумин. В качестве сшивающего агента при получении гелей использовали глутаровый альдегид. Кровоостанавливающие свойства композиций исследовали в опытах *in vitro* на гемоагулографе N-331 и *in vivo* на экспериментальных животных. Координацию ионов кальция на ХТЗ исследовали методом ИК - спектроскопии на спектрометре Infracum FT 801. Кровоостанавливающие материалы в форме губок получали на основе: сополимера ХТЗ-полиГЭМА, полиола и изоцианата. Дисперсии НЧ серебра получали в растворах ХТЗ в процессе УФ-индуцированного восстановления ионов серебра из прекурсора AgNO₃. Кинетику процесса формирования НЧ и размерные характеристики, структуру, теплофизические, физико-механические свойства их нанокомпозитов на основе ХТЗ изучали с помощью оптической и инфракрасной спектроскопии, динамического рассеяния света (DLS) на анализаторе размеров частиц и дзета-потенциала NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments Corporation, США), рассеяния рентгеновских лучей на малых углах (РМУ), дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК), рентгенофазового анализа (РФА), термогравиметрического анализа, атомно-силовой микроскопии (АСМ). Агрегативную устойчивость дисперсий НЧ серебра оценивали по величине

электрокинетического потенциала, определенного методом электрофоретического рассеяния (ELS). Бактерицидные свойства полученных дисперсий исследовали в опытах на бактериях *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* по стандартным методикам.

На защиту выносятся следующие положения:

- Применение спектрофотометрического метода для изучения конформационных переходов макромолекул ХТЗ в водных растворах в зависимости от рН-среды и температуры.
- Влияние конформационного состояния на эффективность процесса привитой полимеризации ГЭМА и ВП на ХТЗ. Водорастворимые блок-сополимеры ХТЗ-ПВП, способные к биodeградации в организме без негативных последствий.
- ХТЗ, комплексносвязанный с ионами кальция, как матрица для факторов крови при тромбообразовании.
- Практическая значимость синтезированных кровоостанавливающих материалов в виде гелей, пленок, губок.
- Результаты комплексного исследования формирования композиций на основе ХТЗ с НЧ серебра, их физико-механические, структурные, теплофизические, бактерицидные свойства.

Обоснованность и достоверность полученных результатов обеспечивались комплексным подходом к решению поставленных задач с использованием современных методов экспериментальных исследований и их воспроизводимостью.

Апробация результатов работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на IV Международной конференции Российского Химического общества имени Д.И. Менделеева «Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов» (Москва, 2012), VII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Менделеев-2013» (Санкт-Петербург, 2013), 15 Международной научной конференции «High-Techin Chemical Engineering - 2014» (Звенигород, 2014), X Санкт-Петербургской конференции молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2014), Шестой Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2014» (Москва, 2014), Форуме молодых ученых «U-NOVUS» (Томск, 2014), Международной конференции «Frontiers in polymer science» (Италия, 2015), Европейском полимерном конгрессе (Германия, 2015), Международной конференции «РосХит-2016» (Уфа, 2016).

Работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации (№ 4.1537.2014/К и № 4.3760.2017), программы «У.М.Н.И.К.» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (№ 1508ГУ1/2014 и № 5654ГУ2/2014)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 статьи, включенные в перечень ВАК РФ, получен 1 патент РФ на изобретение, 1 евразийский патент на изобретение.

Личный вклад автора заключался в непосредственном участии во всех этапах диссертационной работы, включая постановку целей и задач исследования, планирование и выполнение экспериментов, анализ и интерпретацию полученных данных, оформление и подготовку по результатам исследований заявок на

изобретения, публикаций в виде статей и докладов на конференциях различного уровня. Эксперименты, связанные с определением размеров НЧ методом РМУ, выполнены совместно с к.ф.-м.н. Грачевой Т.А. (физический факультет ННГУ им. Н.И. Лобачевского), теплофизические свойства образцов исследованы совместно с д.х.н., профессором Маркиным А.В. (химический факультет ННГУ им. Н.И. Лобачевского). Определение размеров частиц методом DLS и ММ методом ГПХ проводили с использованием оборудования ЦКП «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» (НИИ химии ННГУ им. Н.И. Лобачевского). Биологическая активность нанодисперсий серебра в растворах ХТЗ была исследована совместно со старшим научным сотрудником Смирновой О.Н. (ОБИ ННГУ). Исследования кровоостанавливающих свойств композиций *in vitro* и *in vivo* выполнены в ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского совместно с д.б.н., профессором Корягина А.С.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы из 172 наименований. Работа изложена на 147 страницах машинописного текста и содержит 18 таблиц и 49 рисунков.

Соответствие диссертации паспорту специальности. Диссертационная работа по своим целям, задачам, содержанию, научной новизне и методам исследования соответствует пунктам 1-3, 7, 9 паспорта специальности 02.00.06 – высокомолекулярные соединения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** сформулированы актуальность темы работы, научная и практическая значимость, выбор объектов и методов исследования, цели и задачи. В **литературном обзоре** обобщены сведения о свойствах и применении ХТЗ, ПГЭМА и ПВП, а также о методах получения НЧ серебра и способах их стабилизации. В **экспериментальной части** приведены методы получения привитых и блок-сополимеров, синтеза НЧ серебра в матрице ХТЗ, основные методы анализа структуры и свойств полученных материалов.

Результаты и их обсуждение

1. Исследование конформационных переходов макромолекул хитозана в умеренно-концентрированных водноуксуснокислых растворах

Общим этапом в синтезе материалов на основе ХТЗ и его производных является получение растворов полисахарида в водных растворах кислот. Известно, что конформационное состояние макромолекул ХТЗ различно в зависимости от pH среды – клубок до значений $\text{pH} \sim 3.6$ и спираль – до значений $\text{pH} \sim 4.8-5.5$ ¹. Был выполнен комплекс исследований по разработке методики надежного определения условий конформационных переходов макромолекул полисахарида.

На первом этапе исследовано влияние pH среды на вязкостные свойства умеренно-концентрированных растворов ХТЗ. Наблюдаемая на рисунке 1а зависимость не является линейной. Можно предположить, что такой характер

¹ Федосеева, Е.Н. Вязкостные свойства растворов хитозана и его реакционная способность / Е.Н. Федосеева, Л.А. Смирнова, В.Б. Федосеев // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2008. - № 4. - С. 59-64.

зависимости связан с различным конформационным состоянием макромолекул ХТЗ (спиральная конформация при $\text{pH} > 4$ и конформация клубка при $\text{pH} 3.3-3.5$) и обусловлен изменением размеров макромолекул полимера при изменении pH среды, что подтверждается методом DLS (таблица 1).

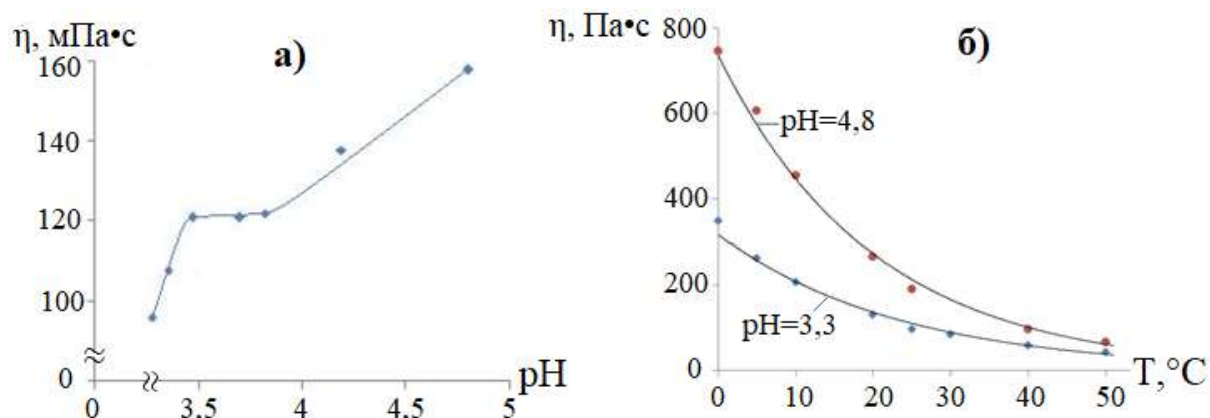


Рисунок 1. Зависимость динамической вязкости раствора ХТЗ от: pH среды, 25°C (а) и температуры (б); $\text{MM} = 1.1 \times 10^5$, $\text{СД} = 0.82$

Таблица 1

Эффективный диаметр частиц ХТЗ при различных pH среды, полидисперсность ~ 1.2

ММ ХТЗ	$D_{\text{эф}}$, нм.	$D_{\text{эф}}$, нм
	$\text{pH}=4,8$ (конформация– спираль)	$\text{pH}=3,3$ (конформация– клубок)
1.1×10^5	623.9	536.9
2.2×10^5	868.9	546.5

Выявлено, что частицы ХТЗ в спиральной конформации, независимо от ММ, характеризуются большим эффективным диаметром $D_{\text{эф}}$, чем в конформации клубка (таблица 1). Эксперимент проводили в растворах ХТЗ при $[\eta] \times C < 1$, когда ассоциация макромолекул незначительна. Следует отметить, что в конформации клубка частицы ХТЗ с вдвое отличающимися ММ полисахарида близки по размерам, тогда как в спиральной конформации они различаются на $\sim 30\%$. При спиральной конформации макромолекул фиксируется $D_{\text{эф}}$, обусловленный диффузионным вращением вытянутых цепей полисахарида, тогда как в конформации клубка диффузионное вращение частиц ХТЗ отражает реальные размеры, определяемые его радиусом инерции. Соответствующие расчеты радиуса инерции по уравнению Флори-Фокса с использованием значений характеристической вязкости подтверждают последнее предположение.

Отличие $D_{\text{эф}}$ макромолекул ХТЗ в различных конформациях проявляется при изучении температурных зависимостей вязкости его умеренно-концентрированных растворов (рисунок 1б). В области температур от 0 до 30°C вязкость растворов ХТЗ со спиральной конформацией макромолекул существенно превышает ее значение в конформации клубка, что, по-видимому, обусловлено сильным внутри- и межцепным взаимодействием вытянутых макромолекул в первом случае. С использованием уравнения Аррениуса–Френкеля–Эйринга рассчитана энергия активации вязкого течения растворов ХТЗ ΔE_a для конформации макромолекул спираль (ΔE_1) и клубок (ΔE_2). ΔE_a жидкости является мерой интенсивности межмолекулярного взаимодействия макромолекул в растворах: $\Delta E_1 = (36.5 \pm 0.4)$ кДж/моль; $\Delta E_2 = (31.1 \pm 0.3)$ кДж/моль.

С ростом температуры вязкость растворов в обеих системах закономерно уменьшается – ассоциаты макромолекул начинают разрушаться, вязкость стремится к одинаковому значению. Этот эффект может быть также обусловлен разрушением водородных связей между звеньями полимерных цепей, что приводит к конформационному переходу спираль-клубок, о чем свидетельствует исследование температурной зависимости светопропускания растворов ХТЗ. Впервые нами рассмотрена возможность применения спектрофотометрического исследования для изучения конформационных переходов макромолекул ХТЗ. На рисунок 2а систематически прослеживается четкое снижение светопропускания в области температур 60-75°C, по-видимому, обусловленное конформационным переходом спираль-клубок, о котором было сказано выше.

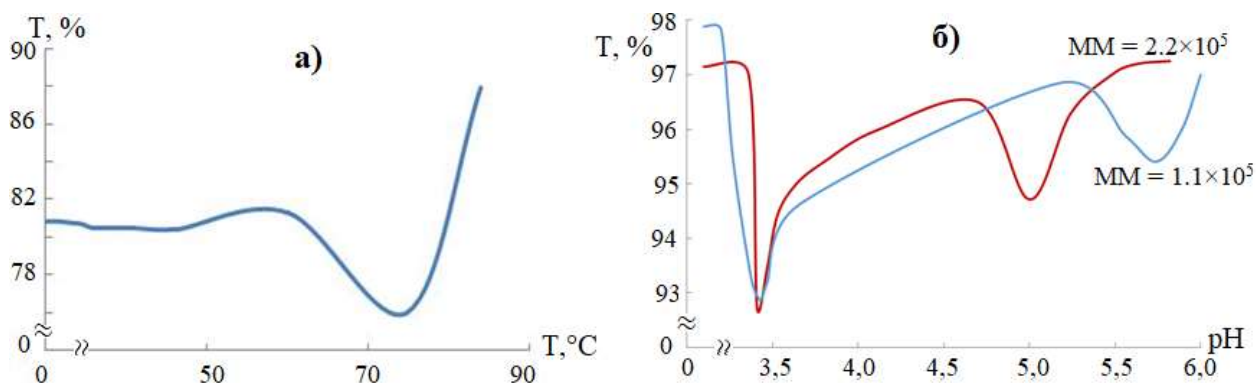


Рисунок 2. Зависимость светопропускания 0,03 мас.% растворов ХТЗ от (а) температуры, $MM = 1.1 \times 10^5$, $CD = 0.82$ и (б) pH среды, $CD = 0.82$, 25°C

На рисунок 2б представлено изменение светопропускания растворов в зависимости от pH среды. На кривых наблюдается две области переходов при $pH \sim 3.4$ и $pH 4.8-6$. Первый минимум на кривых совпадает для обоих значений MM ХТЗ и соответствует области pH для перехода клубок-спираль, выявленной авторами¹ на основе вискозиметрических данных. Второй минимум можно интерпретировать как конформационный переход спираль-глобула при приближении системы к значению pH осаждения ХТЗ. Обнаружено, что макромолекулы с большей MM коллапсируют при более низких значениях pH среды. Полученные данные объясняют выявленную нами аномалию вязкостных свойств растворов ХТЗ – растворы с высокой MM при $pH \sim 5.0-5.2$ менее вязкие, чем с более низкой MM .

Интересно, что для образцов с одинаковой CD переход клубок-спираль строго фиксирован для одного и того же значения pH, независимо от полидисперсности по MM . В противовес этому, переходы спираль-глобула оказываются чувствительными к полидисперсности, имеют четко выраженный полимодальный характер и позволяют вывить тонкие эффекты перехода фракций с разной MM , присутствующих в образце.

2. Модификация хитозана привитой полимеризацией с 2-гидроксипропанкарбонилметакрилатом и N-винилпирролидоном и блок-полимеризацией с поли-N-винилпирролидоном

В свете решения задачи создания кровоостанавливающих и ранозаживляющих композиций существуют ограничения в применении ХТЗ – полимер растворим только в водных растворах кислот и характеризуется низкими физико-механическими свойствами. Решение этих проблем может быть достигнуто модификацией ХТЗ.

Модификацию ХТЗ проводили привитой полимеризацией с ГЭМА и ВП и блок-полимеризацией с ПВП. Было изучено влияние на процесс иницирующей системы, соотношения компонентов и конформации ХТЗ (значений pH среды). Концентрация иницирующих систем во всех реакционных смесях составляла 5×10^{-3} моль/л. Рассмотрим изменение глубины превращения мономера, когда макромолекулы ХТЗ находятся в спиральной конформации (pH 4.8). Наиболее полно протекает реакция в случае с инициатором $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (рисунок 3а) при соотношении $[\text{ГЭМА}]/[\text{ХТЗ}] = 4.8$ моль/(осново-моль) – глубина превращения мономера составляет ~81%, тогда как при других соотношениях – менее 50%. В случае использования иницирующей системы $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (рисунок 3б) максимальная глубина превращения ГЭМА составила лишь ~50%, что свидетельствует о нецелесообразности использования данного инициатора для получения привитого сополимера.

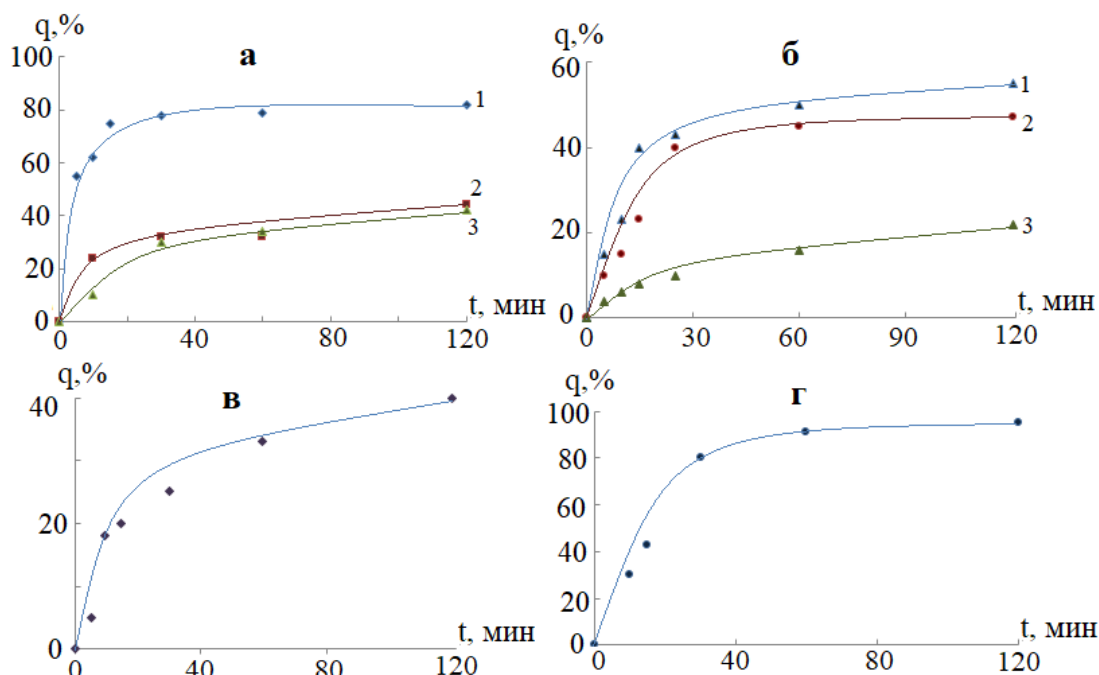


Рисунок 3. Изменение глубины превращения ГЭМА при привитой полимеризации на ХТЗ со временем с различными иницирующими системами. $T = 60^\circ\text{C}$.

а, б – pH 4.8; $[\text{ГЭМА}]/[\text{ХТЗ}] = 4.8$ (1); 2.4 (2); 1.2 (3) (моль/(осново-моль)).

Инициаторы процесса: **а** – $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, **б** – $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$;

в – $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$; pH 4.8; $[\text{ГЭМА}]/[\text{ХТЗ}] = 4.8$ моль/(осново-моль).

г – $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; pH 3.3; $[\text{ГЭМА}]/[\text{ХТЗ}] = 4.8$ моль/(осново-моль)

Было выявлено существенное влияние конформации макромолекул ХТЗ на характер процесса. В случае спиральной конформации глубина превращения ГЭМА достигает всего 81% (рисунок 3а), клубка ~96% (рисунок 3г) при прочих одинаковых условиях синтеза. Кроме того, имеет место изменение фазового состояния реакционной среды. При спиральной конформации макромолекул ХТЗ на протяжении всего процесса система представляла собой прозрачные гомогенные растворы, тогда как при конформации клубок уже на начальных стадиях она представляет собой коллоидный раствор. По-видимому, в спиральной конформации внутри- и межмолекулярные взаимодействия макромолекул ограничивают доступность реакционных центров ХТЗ, что приводит, как будет показано ниже, к образованию большего количества гомополимера. ММ привитых

сополимеров также различна – для синтеза со спиральной конформацией макромолекул ХТЗ $(2,0-2,5) \times 10^5$, для конформации клубок $(4,0-6,0) \times 10^5$. Можно полагать, что различие в фазовом состоянии продуктов синтеза обусловлено их ограниченной растворимостью из-за более высокой ММ привитых цепей сополимера и, вследствие повышенной концентрации, сильным взаимодействием между собой.

Рассмотрим особенности привитой полимеризации ГЭМА на ХТЗ в присутствии другой иницирующей системы $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ (рисунок 3в). Глубина превращения ГЭМА не превышает ~40%, при этом наблюдается резкое уменьшение вязкости системы. Это может быть следствием разрушения цепей ХТЗ под действием образующейся *in situ* азотистой кислоты при гидролизе комплекса $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$. Известно, что HNO_2 разрушает цепи ХТЗ с образованием олигомеров, что было подтверждено в контрольных опытах, выполненных в отсутствие мономера. В то же время ММ привитого сополимера составила 7.3×10^4 , что в ~7 раз больше ММ полученного в контрольном опыте олигомера ХТЗ – это подтверждает образование низкомолекулярного привитого сополимера. Мы не исключаем, что в этом случае продукт имеет смешанную архитектуру из привитых цепей ГЭМА и блоков на концах цепи полисахарида.

Характеристикой привитой полимеризации являются степень и эффективность прививки (СП и ЭП). Наибольший выход полимеризации достигается с инициатором $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ в конформации макромолекул ХТЗ клубок, ЭП в этом синтезе составила 98%, а СП 390% (таблица 2).

Таблица 2

СП и ЭП при привитой полимеризации ГЭМА на ХТЗ, $[\text{ХТЗ}] = 3 \text{ мас.}\%$,
 $[\text{ГЭМА}]/[\text{ХТЗ}] = 4.8 \text{ моль}/(\text{осново-моль})$

Иницирующая система	Конформация макромолекул	η , %	СП, масс. %	ЭП, масс. %
$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	Спираль (рН 4.8)	81	300	91
$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	Клубок (рН 3.3)	96	390	98
$\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$	Спираль (рН 4.8)	40	150	92
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$	Спираль (рН 4.8)	50	180	89

Хорошие результаты по ЭП наблюдаются при использовании инициатора $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ – содержание гомополимера составляет всего 8%. Этот синтез представляет интерес с точки зрения одностадийного метода получения модифицированного водорастворимого продукта олигомерного ХТЗ, перспективного для медицинских приложений, в частности при внутрисполостных операциях для исключения образования нерезорбируемых гранулём при использовании высокомолекулярного ХТЗ.

Подтверждением получения привитых сополимеров являются результаты ИК-спектроскопии. В спектрах появляется полоса 1736 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям $\text{C}=\text{O}$ карбонильных групп ГЭМА, наряду с полосами, характерными для ХТЗ.

Модификацию ХТЗ проводили также привитой и блок-полимеризацией с ВП. Выбор последнего способа обусловлен необходимостью минимизировать содержание синтетического гомополимера в составе биоматериалов.

Исследование кинетики привитой полимеризации ВП на ХТЗ проводили с использованием инициатора $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ при 60 и 70 °С и при двух значениях рН среды – 4.8 и 3.3 (рисунок 4). Существенно влияние температуры – при 70 °С процесс протекает более полно. Наилучшие показатели достигаются, как и в случае с ГЭМА, при полимеризации, когда макромолекулы ХТЗ находятся в конформации клубка: глубина превращения ВП достигает 98%, а ЭП составляет 94% (таблица 3).

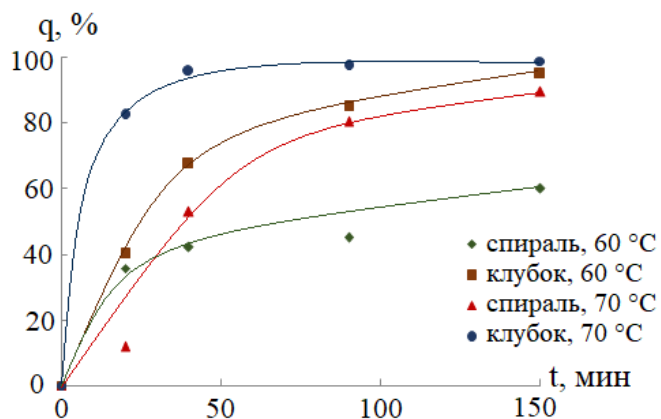


Рисунок 4. Глубина превращения ВП в процессе привитой полимеризации на ХТЗ, инициированной $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. $[\text{ВП}]/[\text{ХТЗ}] = 1$ моль/(осново-моль)

Таблица 3

СП и ЭП при привитой полимеризации ВП на ХТЗ, инициированной $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; $[\text{ХТЗ}] = 3$ мас.%, $[\text{ВП}]/[\text{ХТЗ}] = 1$ моль/(осново-моль)

Т, °С	Конформация макромолекул	q, %	СП, мас. %	ЭП, мас. %
60	Спираль (рН 4.8)	55	20.5	58
60	Клубок (рН 3.3)	95	44	70
70	Спираль (рН 4.8)	85	45	80
70	Клубок (рН 3.3)	98	61	94

Блок-сополимеры ХТЗ с ПВП получали при УЗ обработке раствора смеси гомополимеров – ХТЗ с ММ 2.3×10^5 и ПВП с ММ 1.8×10^4 . Во всех синтезах значение рН среды составляло 4.8, когда макромолекулы ХТЗ находились в конформации спирали, поскольку в этом случае их структура более жесткая, а, соответственно, деструкция цепей ХТЗ посредством УЗ проходила эффективнее.

Возможность ферментативного разрушения блоков ХТЗ амилазой и папаином позволила расшифровать структуру блок-сополимера. Был выполнен ГПХ-анализ исходных гомополимеров (до УЗ), блок-сополимеров, являющихся водорастворимыми (после УЗ), блоков ПВП после деструкции ХТЗ (таблица 4). Выявлено, что после УЗ обработки образуется блок-сополимер ХТЗ с ПВП с $M_w = 2.22 \times 10^5$. Было рассчитано, что число блоков ПВП в макромолекуле составляет 12 с ММ одного блока 6.2×10^3 и количеством звеньев в блоке 60. Соответственно число блоков ХТЗ также равно 12 с ММ блока 1.2×10^4 и количеством звеньев 74.

Таблица 4

Результаты ГПХ-анализа смеси гомополимеров до УЗ обработки и сополимера после; $[\text{ВП}]/[\text{ХТЗ}] = 1.0$ моль/(осново-моль)

Полимер	$M_n \cdot 10^{-5}$	$M_w \cdot 10^{-5}$	M_w/M_n
ХТЗ	1.79	2.36	1.32
ПВП	0.15	0.18	1.20
Сополимер	1.84	2.22	1.21
Блоки ПВП	0.05	0.06	1.20

Таким образом, полученные привитые сополимеры ХТЗ с ГЭМА и ВП в силу высоких значений ММ привитых цепей могут быть использованы при наружном применении, в то время как блок-сополимеры ХТЗ с ПВП, имеющие полиблочное строение, и низкомолекулярные сополимеры ХТЗ-ГЭМА – при внутреннем.

Олигомерная структура блоков ХТЗ и ПВП обеспечит пролонгированное ферментативное расщепление цепей сополимера в организме, не приводящее к образованию нерезорбируемых гранулём.

Исследование физико-механических свойств сополимеров

Пленки сополимеров получали формованием их растворов на лавсановую подложку. Пленки сополимера ХТЗ-ГЭМА, полученные с использованием инициатора Co^{3+} обладают прочностью на уровне ХТЗ, тогда как с Ce^{4+} – повышенными физико-механическими характеристиками: прочность до 33-35 МПа при деформации 3.5-4% (таблица 5).

Таблица 5

Физико-механические свойства ХТЗ и привитых сополимеров ХТЗ-ГЭМА

Инициатор	рН реакционной среды	СП	σ , МПа	ϵ , %
-	4.8	0	25.0 -27.0	1.9
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$	4.8	180	29.0	3.7
$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	4.8	300	32.5	3.5
$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	3.3	390	35.0	4.2

Пленки блок-сополимеров, содержащие звенья ВП, более прочные, чем из исходного ХТЗ (таблица 6). Значение их разрушающего напряжения достигает 54 МПа при сравнительно невысокой деформации – 2-3%. Однако оптимальными с точки зрения практического использования являются пленки с отношением $[\text{ПВП}]/[\text{ХТЗ}] = 0.25$ моль/(осново-моль) – они более эластичны и содержат наименьшее количество ВП. Близкими к блок-сополимерам физико-механическими свойствами обладают привитые сополимеры ХТЗ-ВП – значение разрушающего напряжения достигает 60 МПа при деформации 4%.

Таблица 6

Физико-механические свойства блок- и привитых сополимеров ХТЗ-ПВП

Сополимер	$[\text{ПВП}]/[\text{ХТЗ}]$, моль/(осново-моль)	рН раствора	σ , МПа	ϵ , %
Блок- сополимер	0.25	4.8	46.8	3.6
	0.50	4.8	52.9	2.6
	1.00	4.8	54.2	2.1
	0.25 + 0.5 мас.% глицерина	4.8	40.8	17.6
Привитой сополимер	1.00	4.8	53.4	2.6
	1.00	3.3	60.0	4.0

С целью повышения эластичности пленок был использован глицерин, как пластификатор. Для практических целей достаточно введение 0.5 мас.% глицерина в состав блок-сополимера, что позволит использовать данные пленки в составе перевязочных материалов в медицине и ветеринарии.

Таким образом, полученные привитые сополимеры ХТЗ с ГЭМА и ВП в силу высоких значений ММ привитых цепей могут быть использованы для наружного применения, в то время как блок-сополимеры ХТЗ с ПВП, имеющие полиблочное строение, и низкомолекулярные сополимеры ХТЗ-ГЭМА – для внутреннего.

3. Разработка кровоостанавливающей композиции на основе хитозана, комплексно связанного с ионами кальция

Разработка кровоостанавливающей композиции на основе ХТЗ базировалась на анализе данных о процессе гемостаза при нарушении целостности сосудистых стенок кровеносной системы в организме. ХТЗ способен выполнять функцию матрицы, являющейся аналогом клеточных мембран, не травмирующей и полностью покрывающей раневую поверхность, что подтверждают данные по образованию комплекса ХТЗ-белок.

Изучение образования комплексов ХТЗ-белок и ХТЗ- Ca^{2+}

Было выполнено исследование спектров поглощения ХТЗ с альбумином – одним из основных белков плазмы крови – со временем. Из рисунка 5 видно, что имеет место уменьшение полосы поглощения в области 200-280 нм, соответствующей альбумину. По формуле Калькара:

$$C(\text{г/л}) = 1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$$

рассчитывали концентрацию белка в растворе ХТЗ (мг/мл). Оказалось, что через 3 мин свободный альбумин в растворе не обнаруживается.

Образование комплексов ХТЗ с ионами кальция, являющимися активными участниками процесса тромбообразования в организме, подтверждали методами ИК-спектроскопии и DLS. В ИК-спектрах ХТЗ- Ca^{2+} происходит смещение полос в области 1504 см^{-1} и 1635 см^{-1} , соответствующих валентным колебаниям аминокрупп ХТЗ в область меньших длин волн. Также существенно смещаются полосы поглощения ХТЗ с частотами: 2299, 2337 и 2368 см^{-1} , принадлежащие валентным колебаниям ОН-групп. Из этих результатов следует, что главными центрами комплексообразования с ионами кальция в ХТЗ являются непротонированные amino- и гидроксильные группы полисахарида.

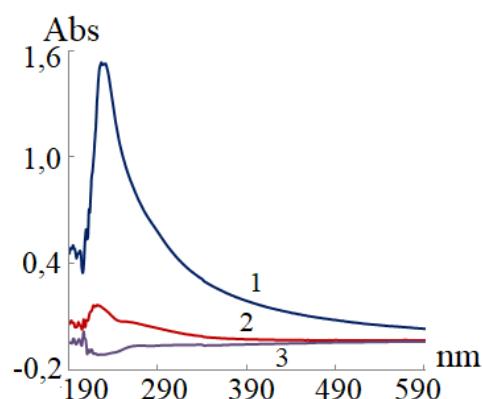


Рисунок 5. Спектры поглощения раствора ХТЗ, содержащего белок: 1 – 0.5 мин, 2 – 1.5 мин, 3 – 3 мин. $T = 25^\circ\text{C}$

Методом DLS выявлено уменьшение эффективного диаметра частиц ХТЗ, комплексно связанных с ионами кальция на ~30% по сравнению с исходным состоянием, независимо от концентрации ионов в композиции (таблица 7).

Таблица 7

Эффективный диаметр частиц ХТЗ в растворе соляной кислоты и ХТЗ, комплексно связанного с ионами кальция

Образец	Солевая форма ХТЗ	+ 20 ммоль/л Ca^{2+}	+ 100 ммоль/л Ca^{2+}
$D_{\text{эф}}$, нм	162	109	105

Таким образом, ХТЗ, комплексно связанный с ионами кальция, способен выполнять функцию матрицы и образовывать полимерные комплексы с белками – факторами свертывания, что позволит существенно уменьшить время гемостаза.

Исследование гемостатической эффективности композиций на основе ХТЗ, содержащих ионы кальция, в опытах *in vitro*

В первой серии опытов было изучено влияние концентрации ионов кальция в композиции на основе сукцината ХТЗ на временные показатели свертывания крови. Выявлено, что при достижении концентрации ионов кальция в композиции ~10-20 ммоль/л, время свертывания крови снижается в 4 раза относительно

контроля (158 с) и при дальнейшем увеличении концентрации остается практически неизменным (таблица 8).

Таблица 8

Общее время ($\tau_{\text{св}}$) свертываемости крови при различных концентрациях ионов кальция в составе композиции в опытах *in vitro*

[Ca ²⁺], ммоль/л	0	0,5	2	5	10	20	100
$\tau_{\text{св}}$, с	158±5	137±8	100±5	60±3	40±2	45±2	43±3

Во второй серии опытов было изучено влияние природы растворителя (солевой формы ХТЗ) в композиции на общее время свертываемости крови (таблица 9). Общее время свертывания крови в контроле после ее забора у экспериментальных животных – без введения кровоостанавливающего средства составило ~156 с.

Таблица 9

Начало ($\tau_{0,\text{св}}$) и общее время свертываемости крови в опытах *in vitro* в зависимости от природы растворителя

Состав композиции	$\tau_{0,\text{св}}$, с	$\tau_{\text{св}}$, с
Контроль	85±7	156±10
10 ммоль/л Ca ²⁺ + 3% ХТЗ в 1.2% УК	137±6	299±7
10 ммоль/л Ca ²⁺ + 3% ХТЗ в 0.5% HCl	28±2	45±3
10 ммоль/л Ca ²⁺ + 3% ХТЗ в 2% ЯК	25±2	46±3

Уксуснокислая форма ХТЗ в композиции приводит к двукратному увеличению времени свертывания крови по сравнению с контрольным опытом. По-видимому, это обусловлено ее разрушительным действием на структурную организацию цитоплазматических мембран клеток крови. С другими кислотами общее время гемостаза практически одинаково и составляет ~45 с.

Дополнительно в опытах *in vitro* исследовали кровоостанавливающее действие композиции в условиях моделирования нарушения свертываемости крови (цитратная кровь). Прослеживается эффективное гемостатическое действие композиции даже на цитратной крови (рисунок 6, кривая 1), несмотря на то, что для этого потребовалась более высокая концентрация ионов кальция чем в условиях относительной нормы, при концентрации ионов кальция порядка 100 ммоль/л время свертывания цитратной крови снижается до 20 с. В контроле без матрицы ХТЗ водные растворы солей кальция сворачивают цитратную кровь лишь за 180 с (рисунок 6, кривая 2).

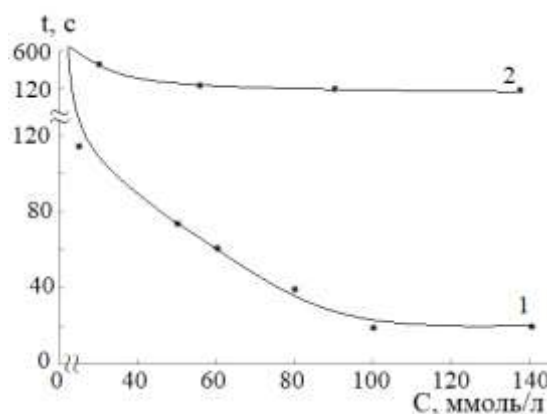


Рисунок 6. Зависимость общего времени свертывания цитратной крови от [Ca²⁺].
1 – кровоостанавливающая композиция;
2 – водный раствор соли кальция

Исследование гемостатической эффективности композиций на основе ХТЗ, содержащих ионы кальция, в опытах *in vivo*

Было определено время остановки венозного и артериального кровотечений экспериментальных животных при действии кровоостанавливающих композиций, содержащих различные кислоты и соли кальция. Концентрация ионов кальция в составе была увеличена до 50 и 100 ммоль/л из-за сильного разбавления композиции током крови и ее частичным смыванием (таблица 10). Эксперименты *in vivo* показали, что наряду с сукцинатом и хлоридом ХТЗ эффективным кровоостанавливающим действием обладают также композиции ХТЗ в растворах с аспарагиновой и никотиновой кислотами, но лучше себя проявляют именно двухосновные кислоты. Во всех случаях использовали минимальную концентрацию кислоты, обеспечивающей растворимость ХТЗ. Из солей кальция наиболее эффективными прокоагулянтами оказались композиции, содержащие глицерофосфат кальция.

Таблица 10

Время свертывания крови $\tau_{\text{св}}$ в опытах *in vivo* при использовании кровоостанавливающих композиций на основе ХТЗ в водных растворах различных кислот, содержащих ионы кальция

Композиции на основе ХТЗ	$\tau_{\text{св.}}, \text{с}$
Контроль	130±10
Янтарная кислота + 100 ммоль/л CaCl_2	40±3
Соляная кислота + 100 ммоль/л CaCl_2	37±2
Никотиновая кислота + 100 ммоль/л CaCl_2	42±2
Аскорбиновая кислота + 100 ммоль/л CaCl_2	71±6
Бензойная кислота + 100 ммоль/л CaCl_2	120±7
Молочная кислота + 100 ммоль/л CaCl_2	50±3
L-аспарагиновая кислота + 100 ммоль/л CaCl_2	38±1
Никотиновая кислота + 50 ммоль/л глицерофосфата кальция	45±3
*Никотиновая кислота + 50 ммоль/л глюканата кальция	35±3
Аспарагиновая кислота + 50 ммоль/л глюканата кальция	85±5
*Аспарагиновая кислота + 50 ммоль/л глюканата кальция	57±3
Аспарагиновая кислота + 50 ммоль/л глицерофосфата кальция	36±1
*Аспарагиновая кислота + 50 ммоль/л глицерофосфата кальция	32±1
*Янтарная кислота + 50 ммоль/л глицерофосфата кальция	40±3
*Янтарная кислота + 50 ммоль/л глюканата кальция	48±2

* – гелевая форма композиции

Для уменьшения эффекта «смыывания» кровоостанавливающего средства в форме раствора, на основе базового состава была разработана и апробирована композиция в виде геля. Время остановки крови при использовании гелей сокращается на ~12 % по сравнению с соответствующими растворами (таблица 10).

При этом следует отметить, что композицией как в виде раствора, так и в виде геля достигается полное закрытие раны, с последующим формированием на ее поверхности воздухопроницаемой пленки, фактически выполняющей роль искусственной кожи. В процессе заживления происходит разрушение пленки под действием тканевых гидролитических ферментов до образования олиго-, ди- и моносахаридов, выступающих в роли пластического и энергетического материала при эпителизации раневой поверхности, ускоряя ее заживление.

Доклинические исследования образцов кровоостанавливающего геля

На экспериментальных животных было изучено токсическое действие кровоостанавливающего геля в процессе доклинических испытаний в Приволжском исследовательском медицинском университете Министерства здравоохранения РФ при внутримышечном введении композиции. Наблюдали развитие воспалительных процессов, возникших, по-видимому, из-за различия pH геля и крови, приводящее к образованию нерастворимых гранул. Модифицированная композиция в виде геля на основе олигомерного ХТЗ и его сополимеров, в том числе блок-сополимера ХТЗ-ПВП, не вызывала инкапсулирования и отторжения в организме, при этом наблюдалась контролируемая биодеструкция полимерной матрицы.

Получение кровоостанавливающей композиции в форме пленки и губки

Задачей исследования стало получение покрытия для ран и ожогов. Пленки получали формованием базовой композиции, содержащей биосовместимый пластификатор, на лавсановую подложку. Проверка в опытах *in vivo* показала, что пленки обладают кровоостанавливающими свойствами на уровне гелей. Они являются газопроницаемыми, что было показано в хроматографических опытах. Предел прочности на разрыв пленок составлял 30 МПа, эластичность материала – 40%. Такая пленка обладает хорошей адгезией к ране, не требует перевязки, надежно защищает рану в процессе эпителизации, и, биodeградируя под действием протеолитических ферментов, образует продукты, которые выступают в качестве энергетического и пластического материала при заживлении.

В экспериментах *in vivo* показана эффективность кровоостанавливающего и ранозаживляющего действия пленки, после срезания участка кожи наркотизированного экспериментального животного (рисунок 7). Перевязки не требовались. Уже на 5 сутки наблюдалась регенерация без воспалительных процессов - поверхность поврежденного участка была чистой, не инфицированной. Естественное полное рассасывание материала происходило в течение 1-1,5 недель после нанесения.



Рисунок 7. Испытание кровоостанавливающей пленки *in vivo*.

При обильных внутриполостных кровотечениях целесообразно применять кровоостанавливающие объемные материалы в виде губок, которые бы тампонируют рану, поглощают кровь и экссудат. Губка была разработана из трехкомпонентной системы – кровоостанавливающей композиции на основе привитого сополимера ХТЗ с ГЭМА, комплексно связанного с ионами кальция, полиола и изоцианата. Кровоостанавливающие свойства материала проверяли в опытах *in vivo* – среднее время свертывания крови составило 30 с. Степень впитываемости и набухания материала представлены на рисунке 8. Для сравнения использовали полиуретановую губку «Сарэл», предоставленную фирмой «Локус». Измеряли высоту поднятия окрашенного физиологического раствора в образцах (рисунок 8а). Высота подъема жидкости в кровоостанавливающей губке составляла

20 мм, в то время как в губке «Сарэл» всего лишь 6 мм. Существенно, что губка, содержащая сополимер ХТЗ-ГЭМА, характеризуется высокой скоростью впитывания физиологического раствора именно в первые минуты (рисунок 8б), что имеет важное значение с точки зрения ее практического использования. Такой эффект, по-видимому, обусловлен различием структуры губок (рисунок 9).

Губка «Сарэл» характеризуется неоднородной ячеистой структурой с закрытыми порами (рисунок 9а). Жидкость в основном заполняет открытый нижний монослой пор. В кровоостанавливающей губке (рисунок 9б) структура более однородная, а открытые поры соединяются через систему сообщающихся капиллярных каналов. Известно, что структуры такого типа характеризуются чрезвычайно высокой скоростью впитывания жидкости.

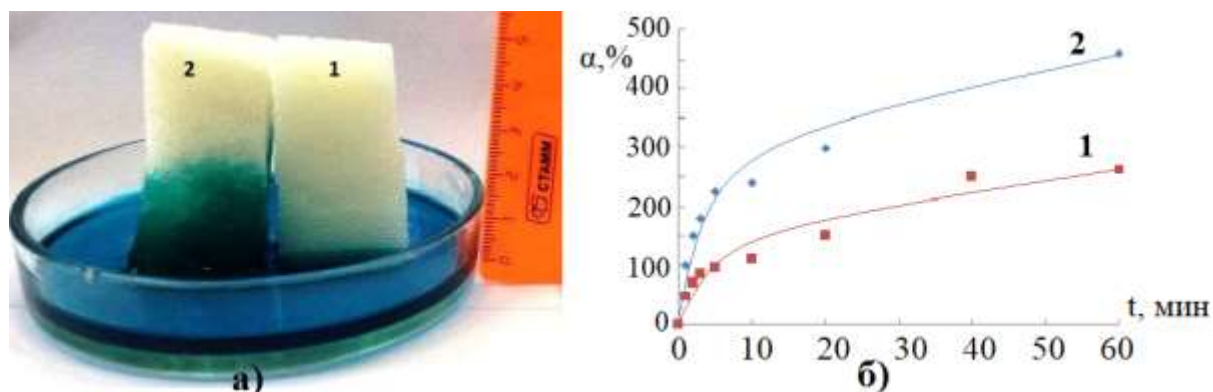


Рисунок 8. а – высота поднятия физиологического раствора в губке «Сарэл» (1) и кровоостанавливающей губке (2); **б** – степень набухания губок во времени

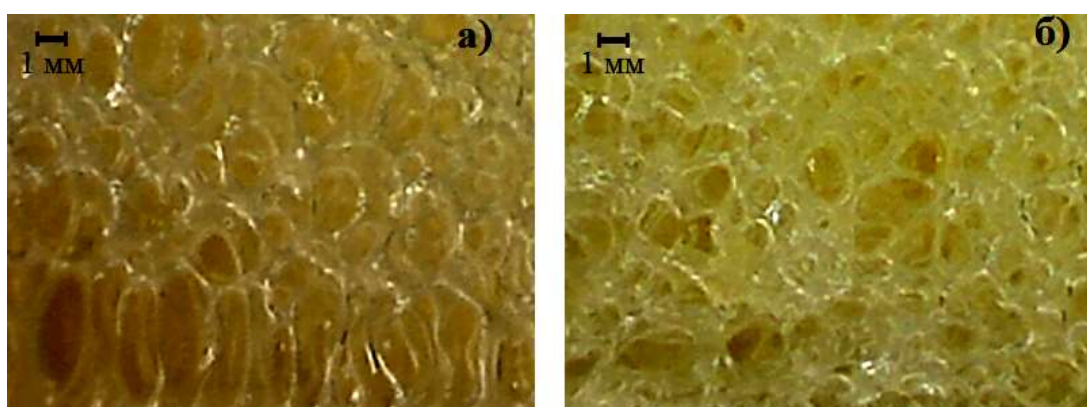


Рисунок 9. Микрофотографии пор губки «Сарэл» (а) и кровоостанавливающей губки (б)

Таким образом, нами разработана губка с эффективным кровоостанавливающим действием и высокой впитывающей способностью. Конкретная рецептура составляет предмет ноу-хау.

При всех достоинствах кровоостанавливающих материалов остается задача придания им бактерицидных свойств, чтобы предотвратить развитие инфекций в ранах, решением которой может быть введение в матрицу ХТЗ НЧ серебра.

4. Получение и исследование свойств дисперсий наночастиц серебра в растворах хитозана

В последние десятилетия НЧ серебра, благодаря своей эффективной антибактериальной, противовирусной активности вызывают все больший научный интерес в связи с ростом резистентности микроорганизмов к антибиотикам. В работе была использована методика получения НЧ серебра из прекурсора AgNO_3

путем УФ-индуцированного восстановления ионов Ag^+ in situ непосредственно в матрице ХТЗ.

Кинетику формирования НЧ в растворах ХТЗ контролировали спектрофотометрически по появлению и нарастанию интенсивности полос поглощения, соответствующих плазмонному резонансу НЧ серебра $\lambda = 380\text{--}480$ нм. В таблице 11 приведены значения длин волн максимумов полос поглощения НЧ серебра, стабилизированных ХТЗ с различной ММ. Видно, что с увеличением ММ ХТЗ наблюдается смещение положения максимума полос поглощения НЧ серебра в коротковолновую область.

Таблица 11

Значения длин волн максимумов полос поглощения НЧ серебра при различных ММ ХТЗ (рН 4.8), $\omega(\text{НЧ Ag}) = 0.01$ мас.%

ММ $\times 10^{-5}$	Длина волны, нм
0.40	424
0.83	420
1.10	415
1.27	412
1.65	400
2.20	387
2.40	383

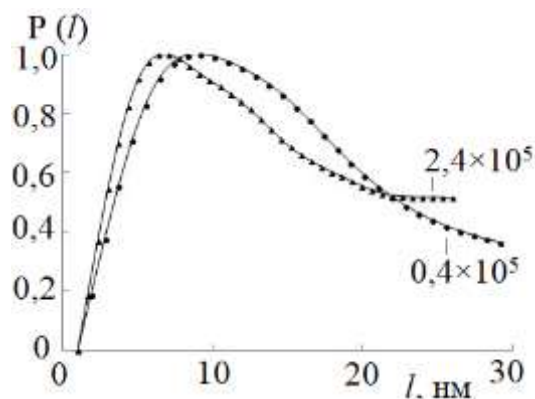


Рисунок 10. Функции распределения по размерам НЧ серебра, при их стабилизации в растворах ХТЗ с различными ММ; рН 4.8, $\omega(\text{НЧ Ag}) = 0.01$ мас.%

Известно², что чем больше значение длины волны максимума полосы плазмонного поглощения НЧ, тем больше их размер. Следовательно, чем больше ММ ХТЗ, тем меньше средний размер НЧ серебра. Полученные результаты подтверждаются данными РМУ по определению средних размеров НЧ серебра для образцов с предельно отличающимися ММ ХТЗ – 0.4×10^5 и 2.4×10^5 (рисунок 10). Средние размеры НЧ составили 12 и 8 нм, соответственно. Таким образом, изменение ММ ХТЗ позволяет регулировать средний размер НЧ серебра.

Размеры НЧ зависят также от конформационного состояния макромолекул ХТЗ-стабилизатора при его одинаковой ММ. Максимумы полосы плазмонного поглощения НЧ смещаются в более коротковолновую область, когда макромолекулы стабилизатора находятся в конформации клубка (рН 3.3) относительно их положения в случае цепей полисахарида в спиральной конформации (таблица 12). Таким образом, показано, что средние размеры НЧ серебра зависят как от ММ ХТЗ

Таблица 12

Значение длины волны максимума полосы поглощения НЧ серебра при различных рН среды и ММ ХТЗ. $\omega(\text{НЧ Ag}) = 0.01$ мас.%

ММ ХТЗ	Максимумы полос плазмонного поглощения НЧ серебра, нм	
	рН 4.8	рН 3.3
$1.1 \times 10^5 + \text{НЧ Ag}$	420	415
$2.2 \times 10^5 + \text{НЧ Ag}$	412	405

² Литманович, О.Е. Закономерности взаимодействий макромолекул с наночастицами металлов и псевдоматричный синтез золь-полимер-металлических нанокомпозитов / О.Е. Литманович // Высокомолекулярные соединения, Серия С. – 2008. - Т. 50. - № 7. – С. 1370-1396.

– уменьшаются с увеличением ММ полисахарида, – так и от конформационного состояния его макромолекул.

Нами впервые исследовано влияние НЧ серебра на размерные характеристики ($D_{эф}$) частиц ХТЗ в растворе методом DLS (таблица 13). Образование комплекса полимер-НЧ во всех системах приводит к уменьшению размеров частиц по сравнению с исходными макромолекулами ХТЗ. Следует отметить при этом два обстоятельства:

1. Размеры частиц комплексов ХТЗ-НЧ для спиральной конформации макромолекул ХТЗ меньше, чем для конформации клубка.
2. В случае спиральной конформации макромолекул ХТЗ при образовании комплекса с НЧ, происходит тем более существенное снижение размеров комплексов (по сравнению с исходной макромолекулой ХТЗ), чем больше ММ полимера. Так, размер комплексов, сформированных в полимере с $ММ = 8.78 \times 10^5$, сокращается в 4 раза по сравнению $D_{эф}$ макромолекул исходного ХТЗ. Можно предположить, что тот эффект обусловлен формированием большего числа НЧ серебра на более длинной спирали полисахарида, и, соответственно, большее число участков цепи ХТЗ сжимается при их стабилизации. Для макромолекул ХТЗ в конформации клубок тенденция к сжатию при стабилизации НЧ также прослеживается, но не в столь значительной степени.

Таблица 13

$D_{эф}$ частиц ХТЗ и комплексов ХТЗ-НЧ серебра при различных рН.
Полидисперсность во всех системах ~ 1.25 . $\omega(\text{НЧ Ag}) = 0.01 \text{ мас.}\%$

ММ ХТЗ	$D_{эф}$, нм, рН 4.8 (конформация спираль)	$D_{эф}$, нм, рН 3.3 (конформация клубок)
1.05×10^5	623.9	536.9
$1.05 \times 10^5 + \text{НЧ Ag}$	292.1	390.1
2.20×10^5	868.9	546.5
$2.20 \times 10^5 + \text{НЧ Ag}$	295.4	415.3
8.78×10^5	2568.0	-
$8.78 \times 10^5 + \text{НЧ Ag}$	636.0	-

Методом ИК-спектроскопии показано, что активными центрами стабилизации НЧ Ag в ХТЗ являются группы NH_2 - и OH - полисахарида, поскольку в спектрах нанокомпозитов наблюдается характерное смещение полос с 1712 см^{-1} до 1728 см^{-1} , соответствующее валентным колебаниям N-H амино-групп полисахарида, и смещение полос в области $2800\text{-}3000 \text{ см}^{-1}$, отвечающие колебаниям OH -групп.

Методом ELS была исследована агрегативная устойчивость дисперсий НЧ, стабилизированных ХТЗ. Полученные значения электрокинетического потенциала составили $\sim 50 \text{ мВ}$, что существенно превышает пороговое значение коагуляции дисперсий и говорит об их агрегативной устойчивости.

Таким образом, было впервые выявлено взаимное влияние НЧ и ХТЗ-стабилизатора на их размерные характеристики. Комплексное исследование по формированию НЧ серебра в растворах ХТЗ было продиктовано поставленной задачей по разработке кровоостанавливающих средств с бактерицидным эффектом.

Исследование бактерицидных свойств дисперсий НЧ серебра

Выявлено, что дисперсии НЧ серебра с размером НЧ $\sim 8 \text{ нм}$, сформированные в растворах ХТЗ с более высокой ММ, проявляют ярко выраженную

бактерицидную активность, особенно для бактерий вида *Escherichia coli* (грамотрицательная бактерия) (таблица 14).

Таблица 14

Бактерицидная активность дисперсий НЧ серебра, стабилизированных ХТЗ.

$\omega(\text{НЧ Ag}) = 0.001 \text{ мас.}\%$

ММ ХТЗ в растворах дисперсий НЧ	λ_{max} , нм	Средний размер НЧ Ag, нм	Зона ингибирования роста бактерий, мм		
			<i>Esch. coli</i> , Грам(-)	<i>Ps. Aerugin</i> , Грам(-)	<i>Staph. Aureus</i> , Грам(+)
2.40×10^5	383	8	6	3	2
** 2.40×10^5	-	-	1	0.5	0.5
0.40×10^5	424	12	3	1	1
** 0.40×10^5	-	-	0	0.5	0.5

** - растворы сравнения, не содержащие НЧ серебра

Увеличение размера НЧ серебра всего лишь до 12 нм приводит к резкому снижению бактерицидной активности. Из таблицы 14 видно, что соответствующие растворы сравнения ХТЗ, не содержащие НЧ серебра, проявляют лишь бактериостатический эффект. Полученные результаты позволили получить кровоостанавливающие и ранозаживляющих материалы на основе ХТЗ в виде растворов, гелей, губок и пленок с высоким бактерицидным эффектом.

Исследование структурных и физико-механических свойств нанокompозитов

В перспективе как научного интереса, так и практического использования нанокompозитов необходимым является определение температурных границ их применения и физико-механических свойств. Исследовано влияние различных концентраций НЧ серебра на температуру стеклования (T_g) и начала термической деструкции (T_d) композитов на основе ХТЗ (рисунок 11).

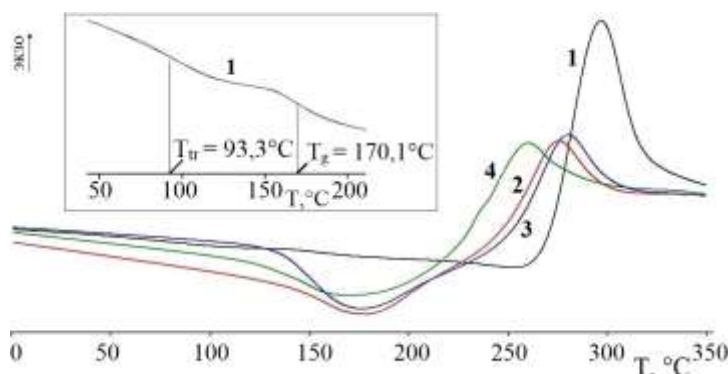


Рисунок 11. ДСК-кривые ХТЗ (1) и его композитов, содержащих НЧ серебра (2-4)

Таблица 15

Теплофизические характеристики ХТЗ и его композитов, содержащих НЧ Ag

$\omega(\text{НЧ Ag})$ в композите, мас. %		$T_g, ^\circ\text{C}$	$T_d, ^\circ\text{C}$
1	0	170.3	298
2	0.0015	161.1	275
3	0.003	150.2	280
4	0.15	150.0	260

Соответствующие T_g и T_d приведены в таблице 15. Для ХТЗ (рисунок 11, кривая 1) наблюдается β -переход, обусловленный вибрацией пиранозного кольца вокруг гликозидной связи, в области 70–110°C (T_{tr}) и расстеклование в области 160–180°C. Переход в области T_g происходит из-за изменения структуры ХТЗ, состоящей из аморфных и высокоупорядоченных частей. Незначительные количества НЧ серебра ($< 0.2 \text{ мас.}\%$) снижают значения T_g и T_d (таблица 15, рисунок 11, кривые 2-4) композитов на 20 и 38°C, соответственно.

Различие в температурных переходах мы связываем с различной структурной организацией в образце. Экспериментальным подтверждением

предположения являются данные РФА и АСМ. Из дифрактограммы (рисунок 12а) видно, что в пленке исходного ХТЗ в области малых углов ($15-25^\circ$) наблюдаются как аморфное гало, так и кристаллические структуры. Присутствие НЧ приводит к почти полной ее аморфизации. Видимо, это связано с участием функциональных групп ХТЗ в стабилизации НЧ серебра, что исключает образование упорядоченных структур.

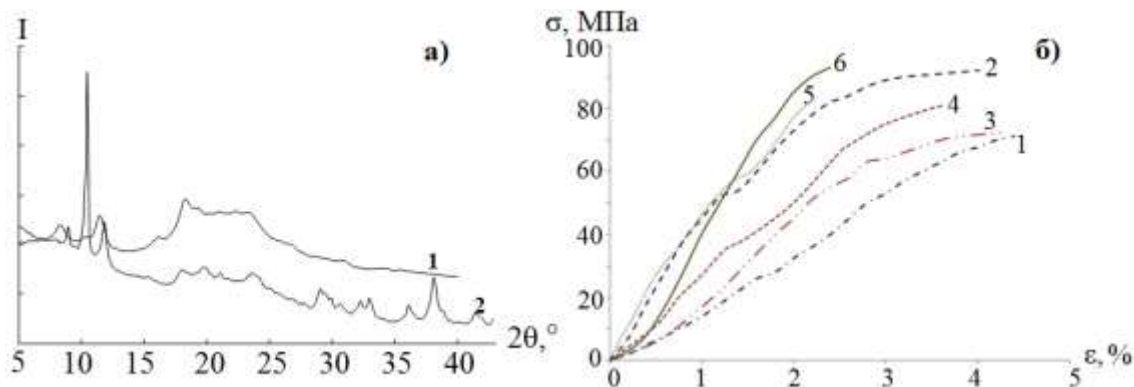


Рисунок 12. а) дифрактограммы образцов ХТЗ (1) и его нанокompозита (2).

б) деформационные кривые пленок ХТЗ, приготовленных из растворов:

1, 2 – pH 4.8 ($MM = 1.05 \times 10^5$); 2 – $\omega(\text{НЧ Ag}) = 0.01$ мас.%;

3, 4 – pH 3.3 ($MM = 1.05 \times 10^5$); 4 – $\omega(\text{НЧ Ag}) = 0.01$ мас.%;

5, 6 – pH 4.8 ($MM = 2.20 \times 10^5$); 6 – $\omega(\text{НЧ Ag}) = 0.01$ мас.%.

Влияние НЧ серебра также отражается на физико-механических свойствах ХТЗ (рисунок 12б). Пленки на основе солевой формы ХТЗ, содержащие НЧ серебра, обладают более высоким значением разрушающего напряжения – до 93 МПа в случае спиральной конформации и 80.8 МПа в конформации клубка, что на ~ 10 МПа больше, чем у исходных образцов из солевой формы ХТЗ. Эластичность пленок остается практически неизменной.

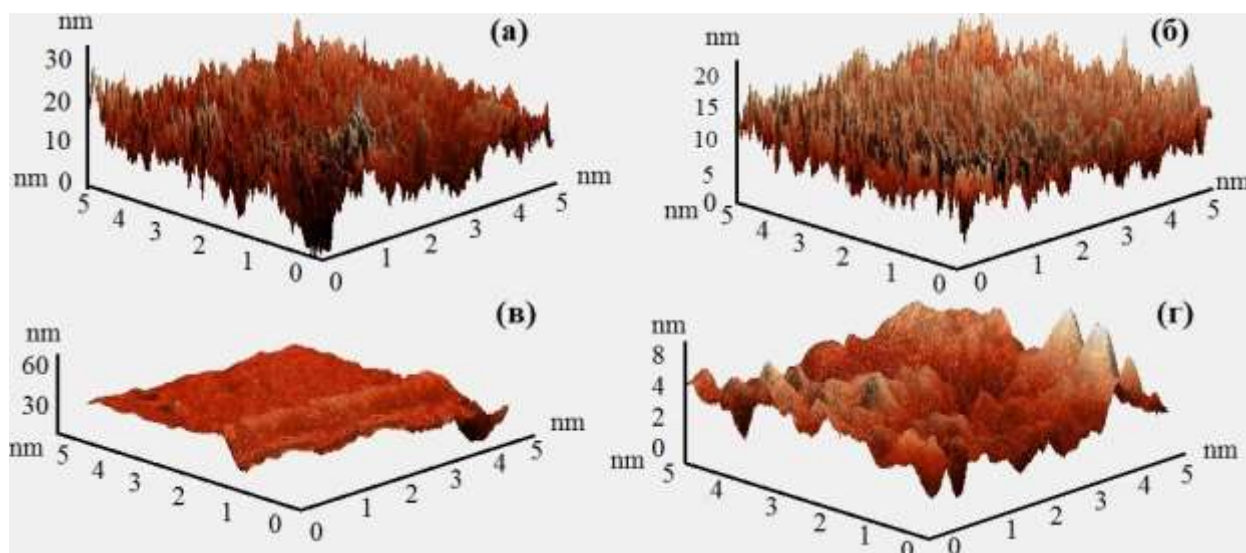


Рисунок 13. Топография поверхностей пленок ХТЗ ($MM = 1.05 \times 10^5$), полученных из растворов: **(а)** – pH 4.8; **(б)** – pH 4.8, $\omega(\text{НЧ Ag}) = 0.01$ мас.%; **(в)** – pH 3.3; **(г)** – pH 3.3, $\omega(\text{НЧ Ag}) = 0.01$ мас.%

Структурные различия проявляются и в топографии поверхности пленок, полученных из растворов ХТЗ с отличающимся конформационным состоянием макромолекул (рисунок 13). Пленки ХТЗ, полученные из растворов с

макромолекулами в конформации клубка, характеризуются чрезвычайно однородной поверхностью с параллельной укладкой структур фибриллярного типа. В случае спиральной конформации поверхность пленки становится неоднородной с вертикально ориентированными структурами пирамидального типа. Введение НЧ серебра в композиты в случае конформации макромолекул ХТЗ спираль сохраняет характер поверхности, а в случае клубка – существенно изменяет, нарушая параллельную укладку структур и делая ее бугристой.

Выводы

1. Показана применимость спектрального метода исследования для определения конформационного перехода клубок-спираль и спираль-глобула макромолекул ХТЗ в воднокислотных растворах. Конформационный переход спираль-клубок является рН- и термочувствительным и не зависит от ММ ХТЗ при одинаковой степени деацетилирования. Эффективные размеры макромолекул одних и тех же образцов ХТЗ в растворе для конформации спирали на 14-35% (в зависимости от ММ), больше чем для клубка.
2. Глубина превращения, степень и эффективность привитой полимеризации ГЭМА и ВП на ХТЗ зависит от конформационного состояния его макромолекул. Указанные характеристики в случае конформации макромолекул ХТЗ - клубок превышают соответствующие характеристики для спиральной конформации при одинаковых условиях синтеза. Получены водорастворимые блок-сополимеры ХТЗ-ПВП с регулируемым размером блоков, биодegradация которых в организме не приводит к негативным последствиям.
3. На основе ХТЗ, комплексно связанного с ионами кальция, разработана универсальная кровоостанавливающая композиция, останавливающая кровотечения в течение 25-40 с, обладающая ранозаживляющим действием. Композиция выполнена в различных модификациях – гель, пленка, губка. Бактерицидный эффект композиции достигался за счет содержания в системе НЧ серебра с размерами ~8 нм.
4. Разработан метод получения агрегативно устойчивых дисперсий НЧ серебра с контролируемым средним размером от 8 до 12 нм УФ-восстановлением ионов серебра из допанта AgNO_3 в растворах ХТЗ.
5. Выявлено взаимное влияние ХТЗ и НЧ серебра при их формировании в растворах полисахарида. Средние размерные характеристики макромолекул ХТЗ существенно снижаются при адсорбции их на НЧ серебра – в 2-4 раза в зависимости от ММ полимера. Наиболее значительно снижение размеров макромолекул в спиральной конформации. В свою очередь, размеры НЧ зависят от ММ ХТЗ и конформационного состояния его макромолекул.
6. НЧ серебра в концентрации < 0.2 мас.% значительно снижают температуры стеклования и деструкции композитов на основе ХТЗ и улучшают их прочность.

Список основных публикаций по теме исследования

1. **Апратина, К. В.** Влияние молекулярной массы хитозана на размерные характеристики наночастиц серебра / **К. В. Апратина, А. Е. Мочалова, Т. А. Грачева, Т. А. Кузьмичева, О. Н. Смирнова, Л. А. Смирнова** // Высокомол. соед. Серия Б. – 2015. – Т. 57. – № 2. – С. 154–158.

2. Мочалова, А. Е. Получение привитых и блок-сополимеров хитозана с виниловыми мономерами, их структура и свойства / А. Е. Мочалова, Е. Н. Круглова, П. А. Юнин, **К. В. Апрытина**, О. Н. Смирнова, Л. А. Смирнова // Высокомолекул. соедин. Серия Б. - 2015. - Т. 57. - № 2. - С. 99–112.
3. **Апрытина, К. В.** Комплексы наночастицы серебра–хитозан и свойства их композитов / **К. В. Апрытина**, М. В. Грибанова, А. В. Маркин, С. С. Сологубов, Л. А. Смирнова // Российские нанотехнологии. - 2016. - Т. 11. - № 11–12. – С. 76-83.
4. **Апрытина, К. В.** Вязкостные свойства умеренно-концентрированных растворов хитозана / **К. В. Апрытина**, Е. М. Храмцова, А. П. Сивохин, Л. А. Смирнова // Известия Уфимского научного центра РАН. - 2016. - №3. - С. 12-15.
5. Патент RU Кровоостанавливающий препарат / **К. В. Апрытина**, Л. А. Смирнова, А. Е. Мочалова, А. С. Корягин, О. Н. Смирнова, А. В. Мальков, А.В. Афонин. - №2545991; Заявл. 18.07.2013; Опубл. 10.04.2015; Бюл. № 10 - 6 с.
6. Патент евразийский Кровоостанавливающее и ранозаживляющее средство / **К. В. Апрытина**, А. С. Корягин, А. Е. Мочалова, Л. А. Смирнова, Е. Н. Григорьева. - № 026104; Заявл. 02.04.2015; Опубл. 31.03.2017; Бюл. № 3 - 8 с.
7. **Апрытина, К. В.** Бактерицидные свойства растворов и пленок на основе хитозана, содержащих наночастицы серебра / **К. В. Апрытина**, Л. А. Смирнова, А. Е. Мочалова, О. Н. Смирнова // Первая Российская конференция по медицинской химии с международным участием: сборник тезисов докладов, Москва. – 2013. - С. 195.
8. **Апрытина, К. В.** Получение и свойства композиций хитозана с наночастицами серебра в дисперсиях и пленках / **К. В. Апрытина**, А. Е. Мочалова, Л. И. Бакина, О. Н. Смирнова, Т. А. Грачева, Т. А. Кузьмичева, Л.А. Смирнова // Шестая Всероссийская Каргинская Конференция «Полимеры — 2014»: сборник тезисов докладов, Москва. – 2014. – Т. 2 (1). – С. 467.
9. **Apryatina, K. V.** Preparation of graft and block copolymers of chitosan with acrylic monomers / **K. V. Apryatina**, K. V. Bogacheva, E. N. Kruglova, A. E. Mochalova, L. A. Smirnova // XV International Scientific Conference «High-Tech in Chemical Engineering - 2014»: Book of abstracts, Zvenigorod. – 2014. - P. 244.
10. **Apryatina, K.V.** Nanostructured materials based on copolymers chitosan and N-vinylpyrrolidone using size-controlled Ag and Au nanoparticles / **K. V. Apryatina**, A. E. Mochalova, S. D. Zaitsev, O. N. Smirnova, L. A. Smirnova // Frontiers in polymer science: Book of abstracts, Riva del Garda, Italy. - 2015. - P. 2.180.
11. **Apryatina, K. V.** Block and graft copolymers of chitosan with vinyl monomers / **Apryatina K. V.**, Kulikov E. E., Mochalova A. E., Smirnova L. A. // European Polymer Congress: Book of abstracts, Dresden, Germany. – 2015. – P. 85.
12. **Apryatina, K. V.** Influence of different nature nanoparticles on the thermophysical properties of polymers / **K. V. Apryatina**, S. S. Sologubov, E. V. Salomatina, A. V. Markin, L. A. Smirnova // International Conference on Thermal Analysis and Calorimetry in Russia. Book of abstracts, Saint-Petersburg. – 2016. - P. 543-546.
13. **Апрытина, К. В.** Особенности вязкостных свойств растворов хитозана / **К. В. Апрытина**, Е. А. Захарычев, А. П. Сивохин, Е. М. Храмцова, Л. А. Смирнова // VII Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры-2017»: сборник тезисов докладов, Москва. - 2017. - С. 253.