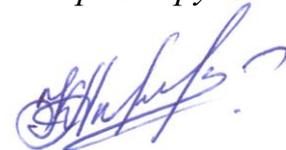


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО»

На правах рукописи



**АПРЯТИНА
КРИСТИНА ВИКТОРОВНА**

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

02.00.06 – высокомолекулярные соединения
(химические науки)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Смирнова Лариса Александровна

Нижний Новгород - 2018

Оглавление

| | |
|---|-----------|
| Введение | 4 |
| Глава 1. Литературный обзор | 12 |
| 1.1. Хитозан..... | 12 |
| 1.1.1. Структура и свойства хитозана | 12 |
| 1.1.2. Области применения хитозана | 16 |
| 1.1.3. Химическая модификация хитозана | 22 |
| 1.2. Наночастицы серебра. Методы их получения, стабилизации и их биологические свойства | 31 |
| Глава 2. Экспериментальная часть..... | 37 |
| 2.1. Используемые вещества и их характеристики..... | 37 |
| 2.2. Методы исследования..... | 39 |
| 2.2.1. Определение молекулярной массы и степени деацетилирования хитозана | 39 |
| 2.2.2. Определение динамической вязкости растворов хитозана | 41 |
| 2.2.3. Определение конформационных переходов хитозана спектрофотометрическим методом..... | 42 |
| 2.2.4. Синтез привитых сополимеров хитозана | 42 |
| 2.2.5. Синтез блок-сополимеров хитозана с N-винилпирролидоном..... | 44 |
| 2.2.6. Изучение комплексообразования хитозана с альбумином и ионами кальция | 44 |
| 2.2.7. Исследование общего времени свертывания крови..... | 45 |
| 2.2.8. Получение кровоостанавливающих губок | 46 |
| 2.2.9. Получение наночастиц серебра, исследование размерных характеристик частиц в дисперсиях | 46 |
| 2.2.10. Исследование устойчивости дисперсий наночастиц серебра | 49 |
| 2.2.11. Исследование теплофизических свойств композитов | 50 |
| 2.2.12. Приготовление пленок из растворов и исследование их физико-механических свойств | 50 |
| 2.2.13. Исследование структуры нанокомпозитов | 51 |

| | |
|---|------------|
| 2.2.14. Исследование бактерицидных свойств дисперсий наночастиц серебра, стабилизированных хитозаном..... | 51 |
| Глава 3. Результаты и их обсуждение | 52 |
| 3.1. Исследование конформационных переходов макромолекул хитозана в водноуксуснокислых растворах..... | 52 |
| 3.2. Модификация хитозана привитой полимеризацией с 2-гидроксиэтилметакрилатом и N-винилпирролидоном и блок-полимеризацией с поли-N-винилпирролидоном | 61 |
| 3.2.1. Синтез привитых и блок сополимеров | 61 |
| 3.2.2. Свойства пленок образцов полученных сополимеров..... | 75 |
| 3.3. Кровоостанавливающая композиция на основе хитозана, комплексносвязанного с ионами кальция | 82 |
| 3.3.1. Изучение образования комплексов хитозан-альбумин, хитозан- Ca^{2+} | 84 |
| 3.3.2. Исследование влияния композиций на основе хитозана, содержащих ионы кальция, на временные показатели свертывания крови в опытах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> | 87 |
| 3.3.3. Доклинические исследования образцов кровоостанавливающего геля . | 96 |
| 3.3.4. Разработка различных форм кровоостанавливающих средств на основе базовой композиции | 98 |
| 3.4. Дисперсии наночастиц серебра, стабилизированные хитозаном | 106 |
| 3.4.1. Получение дисперсий и исследование их свойств..... | 106 |
| 3.4.2. Исследование бактерицидных свойств дисперсий наночастиц серебра..... | 116 |
| 3.4.3. Исследование структурных и физико-механических свойств нанокомпозитов..... | 119 |
| Заключение..... | 125 |
| Выводы..... | 126 |
| Список сокращений..... | 128 |
| Список литературы..... | 129 |

Введение

Актуальность темы исследования. В настоящее время хитозан – 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-, гидроксильных и эфирных функциональных групп.

Несмотря на многочисленные исследования свойств хитозана и его производных и определенные успехи по внедрению научных разработок в практику, особенно в области косметологии и фармацевтики, остаются задачи, требующие доработки и развития. Среди них – получение на основе хитозана материалов с заданными характеристиками, хорошими физико-механическими показателями и высокой гемостатической активностью. Один из путей их решения - блок- и привитая сополимеризация хитозана с биосовместимыми синтетическими полимерами. В этой области исследований остается открытым вопрос о влиянии на синтез гибридных продуктов конформационного состояния макромолекул хитозана, получение на основе сополимеров разнообразных форм кровоостанавливающих и ранозаживляющих средств, а также о придании полученным композициям бактерицидного эффекта. 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 хитозана, из которых наиболее распространенными являются - «Celox™» и «HemCon ChitoGauze PRO». Несмотря на свои положительные свойства – кровоостанавливающее действие, биосовместимость и гипоаллергенность, они обладают рядом недостатков - порошковая форма разогревается в ране и трудно из нее извлекается, 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 хитозана путем привитой и блок-полимеризации с 2-гидроксиэтилметакрилатом (ГЭМА) и N-винилпирролидоном (ВП); комплексное исследование физико-механических, структурных, теплофизических, биологических свойств композиций на основе хитозана, 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 хитозана в растворах.
- Модификация хитозана путем привитой и блок-полимеризации с ГЭМА и ВП, влияние на процесс конформационного состояния макромолекул хитозана.
- Разработка композиций на основе различных солевых форм хитозана, комплексно связанного 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 хитозана.

➤ Изучение кинетики формирования НЧ серебра путем УФ-индуцированного восстановления ионов серебра в растворах хитозана. Исследование влияния конформационного состояния и молекулярной массы (ММ) макромолекул хитозана на размеры НЧ, и НЧ на размерные характеристики макромолекул хитозана 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 хитозана спектрофотометрическим методом. Установлена зависимость размерных характеристик макромолекул хитозана от конформационного состояния. Выявлено, что макромолекулы хитозана при значениях рН среды 4,8 (спиральная конформация) имеют больший размер, чем при значениях рН 3,3 (конформация макромолекул – клубок). Показано влияние конформационного состояния на вязкостные свойства, которые нивелируются с увеличением температуры.

Установлена зависимость глубины превращения мономеров, степени и эффективности привитой полимеризации ГЭМА и ВП на хитозан от конформационного состояния его макромолекул. Глубина превращения и степень прививки мономера в случае конформации макромолекул хитозана – клубок существенно выше тех же значений для растворов хитозана в спиральной конформации при одинаковых условиях синтеза. Получены блок-сополимеры хитозан-поливинилпирролидон (**ПВП**), способные к биодegradации в организме без негативных последствий.

Впервые выявлено взаимное влияние НЧ серебра и стабилизатора-хитозана на их размерные характеристики: размер НЧ серебра уменьшается с увеличением ММ хитозана; формирование НЧ серебра в матрице хитозана существенно снижает средний диаметр его макромолекул. НЧ серебра повышают физико-

механические свойства композиций на основе хитозана и смещают температуры стеклования и разложения композита в область более низких значений.

Практическая значимость работы.

Разработано универсальное кровоостанавливающее средство на основе хитозана, 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 хитозана, комплексносвязанного с ионами кальция в виде геля, применимая не только при наружных, но и при внутренних кровотечениях, обеспечивающая пролонгированную биоутилизацию в организме без негативных последствий.

Объекты и методы исследования. Хитозан - поли((1,4)-2-амино-2-дезоксидеокси)- 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 хитозана исследованы методом ротационной вискозиметрии на приборе Brookfield DV-II+ Pro. Конформационные переходы макромолекул хитозана устанавливали на спектрофотометре «SHIMADZU» (модель UV-1650pc). Хитозан 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 хитозана 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 хитозана и его модифицированных форм, комплексно связанных с ионами кальция. В качестве источников ионов использовали - хлорид, глюконат и глицерофосфат кальция. Взаимодействие хитозана 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 гемокоагулографе N-331 и *in vivo* на экспериментальных животных. Координацию ионов кальция на хитозан исследовали методом ИК - спектроскопии на спектрометре Infracum FT 801. Кровоостанавливающие материалы в форме губок получали на основе: сополимера хитозан-полиГЭМА, полиола и изоцианата. Дисперсии НЧ серебра получали в растворах хитозана 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 хитозана 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 хитозана в водных растворах в зависимости от pH-среды и температуры.
- Влияние конформационного состояния на эффективность процесса привитой полимеризации ГЭМА и ВП на хитозан. Водорастворимые блок-сополимеры хитозана-ПВП, способные к биodeградации в организме без негативных последствий.
- Хитозан, 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 хитозана 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) с использованием оборудования ЦКП «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» (НИИ химии ННГУ им. Н.И. Лобачевского).

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 хитозана 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 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

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Хитозан

1.1.1. Структура и свойства хитозана

Хитозан – один из полимеров, находящихся в лидерах по исследованиям в 21 веке, благодаря своим уникальным полифункциональным свойствам и непрерывным возобновляемым источникам сырья. Изучение свойств хитозана и его производных сулит открытие новых прорывных направлений в различных областях.

Хитозан - линейный полисахарид, состоящий из фрагментов (1→4)-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкана (N-ацетил-глюкозамина D) и (1→4)-2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкана (D-глюкозамина) [1]. Хитозан является продуктом деацетилирования второго по распространенности природного аминополисахарида – хитина, получаемого преимущественно из панцирей ракообразных, экзоскелета насекомых, клеточных стенок грибов и дрожжей. Мировой потенциал сырьевых источников достаточен для производства 150 тыс. т хитозана в год. Транс-расположение заместителей (ацетамидной и гидроксильной групп) у C2- и C3-атомов в элементарном звене макромолекулы хитина обуславливает значительную гидролитическую устойчивость ацетамидных групп. По этой причине отщепление ацетамидных групп хитина удается осуществить либо путем щелочного химического гидролиза в жестких условиях, либо путем ферментативного гидролиза. [2]. Реакция деацетилирования хитина сопровождается одновременным разрывом гликозидных связей полимера, что приводит к снижению его ММ и получению полидисперсного по ММ хитозана

Хитозан, как и хитин, представляет собой аморфно-кристаллический полимер, для которого характерно явление полиморфизма, причем количество структурных модификаций при переходе от хитина к хитозану увеличивается до 6. Сохранение при этом размеров элементарной ячейки кристаллита вдоль оси макромолекулы на уровне соответствующей характеристики хитина (103 нм)

свидетельствует о том, что конформация макромолекул при переходе от хитина к хитозану существенно не изменяется. Конформационные изменения в элементарной кристаллической ячейке хитозана (рисунки 1а и 1б) зависят от наличия молекул воды в системе водородных связей, а также от типа солевой формы, в которой находятся макромолекулы хитозана. При значении рН ~ 5, макромолекулы солевой формы хитозана образуют спиральные конформации. Цепи хитозана в этих условиях упакованы антипараллельно и удерживаются системой водородных связей, в которую встроены молекулы воды по оси а (а), вдоль оси с (б) эти ячейки соединены водородными связями [4].

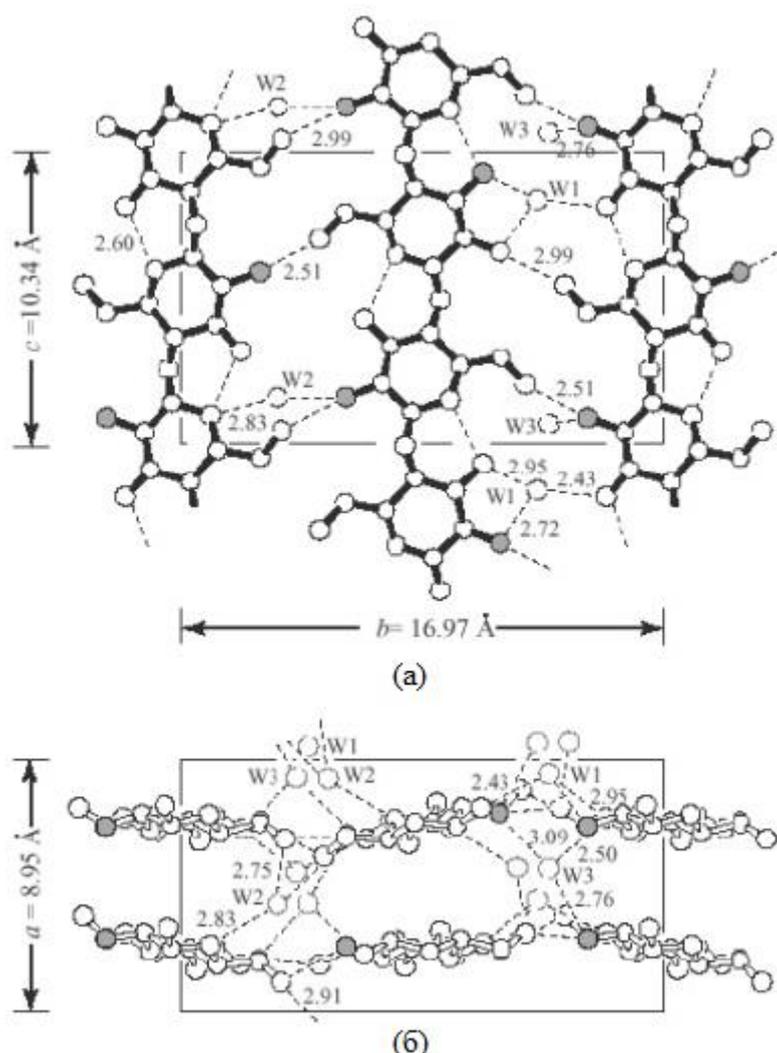


Рисунок 1. Конформация гидратированного хитозана вдоль оси а (а) и вдоль оси с (б) [4]

Длина сегмента Куна макромолекул хитозана в водноуксуснокислых растворах в среднем составляет 48 нм [5].

Образование водородных связей между функциональными группами макромолекул хитозана приводит к его плохой растворимости в воде, поскольку они более прочные, чем между молекулами хитозана и молекулами воды. Тем не менее, высокое содержание полярных групп объясняет высокую гигроскопичность хитозана. [6]

Наличие amino-групп в макромолекуле обуславливает хорошую растворимость полисахарида в водных растворах органических кислот и некоторых неорганических (HCl), причем он способен прочно удерживать в своей структуре растворитель, а также растворенные и взвешенные в нем вещества. [2, 7]. Разнообразие функциональных групп, а также специфика структуры хитозана определяют ряд уникальных свойств полимера – адсорбционные, хелатообразующие и комплексообразующие.

Катионная природа хитозана обуславливает способность полимера взаимодействовать с синтетическими или природными полимерами, содержащими отрицательные заряды. Это свойство также делает хитозан биоадгезивным и позволяет ему легко связываться с поверхностью клеток внешней стороны клеточных мембран живых организмов (белками, гликопротеинами, отрицательно заряженными фосфолипидами) [8].

Следует отметить, что в растворенном виде хитозан обладает более высокими сорбционными свойствами, чем в нерастворенном. Хитозан способен связывать и прочно удерживать ионы металлов (в частности радиоактивных изотопов и токсичных элементов) за счет химических и электростатических взаимодействий и органические водорастворимые вещества, в том числе бактериальные токсины и токсины, образующиеся в толстом кишечнике в процессе пищеварения. Хитозан также связывает предельные углеводороды, жиры и жирорастворимые соединения за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий гидрофобных участков цепи и эффекта молекулярного сита, что сближает его по механизму сорбции с циклодекстринами [9].

Свойства хитозана в растворе определяются, в основном, двумя факторами: повышенной жёсткостью цепи, обусловленной β -(1,4)-гликозидными связями, и

наличием свободных аминогрупп, способных или протонироваться или (наряду с гидроксогруппами) образовывать внутри- и межмолекулярные водородные связи, приводя к ассоциации макромолекул. Это приводит к тому, что макромолекулы хитозана характеризуются сложным поведением в растворах, связанным с полиэлектролитным набуханием данного полисахарида - аномальным повышением вязкости при уменьшении концентрации полимера [10]. Данный эффект является следствием увеличения эффективного объема и асимметрии макромолекул в растворе в результате отталкивания одноименных зарядов, возникающих при протонировании аминогрупп.

Основная макромолекула полностью протонированного хитозана имеет конформацию клубка, которая при высоких значениях $pH \sim 4,5-5,5$ трансформируется в вытянутые спиральные конформации. При этом растёт вязкость: гибкость связи С-С полисахаридов в такой молекуле ниже гибкости обычной высокомолекулярной структуры [11].

При хранении растворов хитозана в статических условиях их вязкость снижается. Этот эффект существенно зависит от концентрации, степени деацетилирования (СД) полимера, pH раствора и природы кислот-растворителей [12]. Однако причины этого явления до сих пор не установлены. Кислотный гидролиз макромолекул хитозана, по мнению авторов [12-15] маловероятен. Существует гипотеза, что снижение вязкости растворов хитозана во времени обусловлено медленными изменениями на уровне конфигурации и, следовательно, химической природой макромолекул [16-18]. Замечено, что с течением времени изменяется не только вязкость растворов полисахарида, но и характер её реограмм. В сравнении со свежеприготовленными растворами, у растворов хитозана в слабokonцентрированной уксусной кислоте с течением времени расширяется диапазон напряжений сдвига, вплоть до реограммы ньютоновской жидкости [19].

Большинство работ, посвященных изучению вязкостных свойств растворов хитозана рассматривают частные случаи – характер водноуксуснокислых или водносолянокислых растворов полимера определенной концентрации [13-14, 19-

20]. В то же время, с точки зрения практического применения, необходим комплексный подход к изучению влияния комплекса свойств – ММ, СД, температуры, рН среды на вязкостные характеристики растворов полисахарида.

Высокая биологическая активность, биосовместимость, биodeградируемость, мукоадгезивность делают хитозан привлекательным объектом для использования в разнообразных направлениях.

В результате многочисленных исследований к настоящему времени установлен ряд биологических эффектов хитозана [9]:

- гипополипидемический и гипохолестеринемический (связывает и выводит из организма избыток жиров и холестерина);
- регулирует кислотность желудочного сока, обладает противоязвенным действием;
- нормализует микрофлору кишечника;
- гипоаллергенный;
- радиопротекторный (связывает и выводит радиоактивные изотопы);
- иммуностимулирующий (стимулирует ряд функций иммунной системы, повышает устойчивость организма к инфекциям);
- антиоксидантный (нейтрализует токсичные перекисные соединения);
- антибактериальный и противовирусный (угнетает активность ряда микроорганизмов, защищает организм от некоторых вирусных инфекций);
- регенерирующий (стимулирует заживление ран, язв, ожогов).

1.1.2. Области применения хитозана

Вышеперечисленные свойства определили ряд наиболее распространенных областей применений хитозана, которые приведены в таблице 1.

Таблица 1. Основные области применения хитозана

| Область | Применение | |
|------------------|---|---------|
| Биомедицинские и | 1. Проводятся интенсивные исследования по возможности использования хитозана в качестве | [21-28] |

| | | |
|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| <p>фармацевтические материалы</p> | <p>полимерной матрицы для доставки лекарственных веществ с пролонгированным высвобождением путем их медленной диффузии, поскольку большинство веществ сами по себе характеризуются низкой проникающей способностью через биологические мембраны. Биологические системы, основанные на хитозане, могут быть использованы для доставки белков/пептидов, факторов роста, противовоспалительных лекарств, антибиотиков, противоопухолевых препаратов и других лекарственных средств к больным клеткам.</p> <p>2. Хитозан используют как наполнитель, добавляемый в таблетки и капсулы лекарств к активному препарату, обеспечивающий контролируемое высвобождение состава за счет комбинации диффузии и медленного распада матрицы высокомолекулярного полимера.</p> <p>3. На основе хитозана синтезируют гидрогели различной структуры за счет образования ионных комплексов с отрицательно заряженными молекулами (сульфаты, цитраты, фосфаты) и анионными металлами Pt (II), Pd (II), и Mo (VI), полиэлектролитных комплексов (с белками, гепарином, хондроитинсульфатом, карбоксиметилцеллюлозой и др.) или за счет формирования полимерных смесей между хитозаном и другими водорастворимыми неионными полимерами (поливиниловый спирт и др.).</p> <p>Полученные гидрогели могут быть использованы в качестве основы для создания ранозаживляющих повязок, благодаря своей совместимости с живой</p> | <p>[29-30]</p> <p>[21, 31-36]</p> |
|-----------------------------------|---|-----------------------------------|

| | | |
|-----------------------------------|--|--|
| | <p>тканью, вязкоупругой природе и способности к контролируемому высвобождению растворенных веществ.</p> <p>4. Хитозан рассматривается как перспективный компонент в тканевой инженерии – кожных, костных, хрящевых, нервных, тканей печени, т.к. обладает биосовместимостью, придает механическую прочность, деградирует со временем, облегчая рост новой ткани, и является клеточной и молекулярной основой для миграции и культивации на нем необходимых клеток.</p> <p>5. Гемостатики</p> <p>6. Ведутся исследования по использованию хитозана для производства новых биорассасывающихся шовных материалов. Преимущество хитозана по сравнению с многими другими полимерами в этой сфере – отсутствие на него аллергических реакций организма.</p> <p>7. Среди сорбентов хитозан является единственным, обладающим собственной биологической активностью. Хитозан применяется как средство, способствующее снижению веса, а также для улучшения холестеринового обмена и перистальтики кишечника.</p> | <p>37-43</p> <p>[44]</p> <p>[45-48]</p> <p>[49-50]</p> |
| <p>Косметика для кожи и волос</p> | <p>Хитозан и его производные находят всё более широкое применение в косметике в качестве гелеобразователя, увлажнителя, плёнкообразующего и противовоспалительного средства. Он используется в составе кремов, шампуней, дезодорантов, гелей для душа, жидкого мыла, гелевых зубных паст, средств для укладки, завивки, а также лосьонов для волос. Благодаря способности хитозана удерживать влагу, увеличивается электропроводность поверхности волос, ингибируется</p> | <p>[51-52]</p> |

| | | |
|----------------------------|---|---------|
| | <p>накопление образующихся электростатических зарядов, а наличие одновременно катионных групп приводит к сильному эффекту удаления отрицательных зарядов с поверхности волос за счёт нейтрализации, в результате у хитозана проявляются более ярко выраженные антистатические свойства по сравнению с другими поверхностно-активными веществами.</p> | |
| Сельское хозяйство | <p>Хитозан перспективен для использования в средствах обработки семян с целью повышения урожайности. Исследования показали, что семена, покрытые хитозаном, дают всходы с усиленной иммунной системой и более устойчивые к болезням. В дальнейшем растения имеют мощную корневую систему, хорошие верхушки и сильные стебли, помогающие растению взять максимальное количество питательных веществ и влаги, а также ослабить эрозию почвы.</p> <p>Хитозан известен как индуктор болезнеустойчивости. Защитное действие хитозана основывается на активации естественных (имунных) ресурсов растений в ответ на появление фитопатогенов. Существенным также является то, что хитозан - это хорошее росторегулирующее вещество. Росторегулирующая активность хитозана объясняется тем, что при разложении его образуются соединения азота, который легко усваиваются, находясь в непосредственной близости от корней растений.</p> | [53-54] |
| Пищевые и кормовые добавки | <p>В настоящее время хитозан начал применяться как средство лечения и профилактики кишечных расстройств у молодняка сельскохозяйственных животных, как носитель ветеринарных лекарственных</p> | [55-57] |

| | | |
|---------------------|---|---------|
| | <p>средств, благодаря способности проходить, не разрушаясь, через многокамерный желудок жвачных животных.</p> <p>Хитозан используется в кормах для животных и рыб. Свойство хитозана связывать тяжёлые металлы и радионуклиды позволяет понизить уровень загрязнения молока и мяса животных, питавшихся зараженными кормами.</p> <p>Хитозан используется в качестве консерванта. Водорастворимое производное хитозана (N-карбоксиметилхитозан) предотвращает порчу мяса. Оно связывает атомы железа и предохраняет их от реакции с кислородом и тем самым от серии реакций, разрушающих вкусовые качества мяса.</p> <p>Хитозан входит в основу препаратов, повышающих лёжкость плодоовощной продукции</p> | |
| Очистка сточных вод | На основе хитозана разрабатываются составы комплексных флокулянтов и коагулянтов, высокоэффективных в процессе водоочистки. | [58-59] |

Несмотря на приведенный широкий спектр применения хитозана, подавляющее большинство составов, средств и лекарств на его основе все еще находится в стадии разработок и исследований. Кроме того, остаются ниши, которые открывают возможности для получения новых важных в практическом приложении материалов.

Одним из перспективных направлений использования хитозана в настоящее время является разработка композиций, обладающих комплексным действием, включающим экспрессную остановку крови, ранозаживление, высокую конгруэнтность материала к раневой и ожоговой поверхности и бактерицидность, в связи с остро стоящей проблемой травматичности в результате чрезвычайных

ситуаций, при производственных и бытовых травмах и отсутствием универсальных средств защиты. В свете поставленной задачи по созданию композиции как основы кровоостанавливающего и ранозаживляющего средства рассмотрим более подробно существующий гемостатические средства. Первые попытки использования хитина и хитозана для заживления ран, в том числе ожоговых были предприняты в середине 1970-х годов [60]. Было установлено, что хитозан обладает антимикробной активностью, способностью поглощать биологические жидкости и помогать регенерации тканей. Хитозановые материалы не вызывают аллергических реакций [9, 61]. Хитозан значительно улучшает микроциркуляцию в мелких сосудах, уменьшает агрегацию и тромбозы, усиливает обмен тканевой жидкости. Волокнистое строение, полная совместимость с тканями организма, хорошие адгезивные качества делают хитиновые волокна одним из лучших источников для биологических протезов, биопленок при заживлении ран и ожогов. Достигнут значительный прогресс также в области создания гемостатиков. За последние 20 лет появилось новое поколение узконаправленных местных гемостатических агентов - Quick-clot® (Z-Medica Corporation, США), QuikClotCombat Gauze® (Z-Medica Corporation, США), Celox™ (MedTrade Products Ltd, Великобритания), «HemCon» (HemCon Medical Technologies, Inc., США), «Гемостоп» ("Профит Фарм", Россия). Тем не менее, эти средства имеют ряд недостатков. В состав большинства из них входят порошкообразные цеолит, смектит или каолин – минералы, известные своими абсорбирующими свойствами. При их нанесении существует риск возникновения болезненных ощущений, вследствие локального разогрева и раздражения раны при соприкосновении с грубыми мелкодисперсными компонентами, кроме того они требуют удаления из раны. Все средства узконаправлены и не обладают дополнительным регенеративным эффектом. Таким образом, важной остается задача создания биосовместимых и биоразлагаемых композиций, обладающих кровоостанавливающими, ранозаживляющими и бактерицидными свойствами. Актуальность этой работы подчеркивает постановление правительства от 24 декабря 2013 г. № 1224 "Об установлении запрета и ограничений на допуск

товаров, происходящих из иностранных государств, работ (услуг), выполняемых (оказываемых) иностранными лицами, для целей осуществления закупок товаров, работ (услуг) для нужд обороны страны и безопасности государства". Перспективно при создании таких материалов использовать полусинтетический полимер хитозан, обладающий выше перечисленным уникальным комплексом свойств. Существенно, что продукты биодegradации хитозана в ране под действием ферментов могут выступать в качестве строительного материала при ее эпителизации, ускоряя процесс ранозаживления [62-63]. Модификация хитозана привитой или блок-сополимеризацией открывает возможности получения более широкого спектра материалов с заданными характеристиками, таких как пленки с высокими физико-механическими свойствами и губки, с эффективным влагопоглощением.

1.1.3. Химическая модификация хитозана

Для расширения спектра материалов на основе хитозана необходима его модификация, что, в частности, связано с нерастворимостью в органических и водных средах и хрупкостью этого полимера. С целью увеличения растворимости полисахарида в водных средах, повышения физико-механических показателей пленочных материалов на его основе, транспортных свойств мембран для разделения жидких и газовых смесей, регулирования влагоудерживания при получении гелей в настоящее время проводят его химическую модификацию по реакциям полимераналогичных превращений, путем привитой и блок-сополимеризации, а также созданием смесевых композиций с синтетическими полимерами [64-66]. К настоящему времени предложено много самых разнообразных способов модификаций хитозана реакциями полимераналогичных превращений, а в последние два десятилетия акцент сместился в сторону привитой и блок-сополимеризации.

Модификация хитозана методом его привитой полимеризации.

Привитые сополимеры – разветвленные высокомолекулярные соединения, макромолекулы которых состоят из химически связанных последовательностей

мономерных звеньев основной цепи и боковых ответвлений, различающихся по составу или (и) строению.

Синтез привитых сополимеров дает возможность сочетать в одной макромолекуле полимерные последовательности разнообразных по свойствам высокомолекулярных соединений – карбоцепных и гетероцепных, гидрофобных и гидрофильных, гибких и жестких, регулярных и нерегулярных, природных и синтетических. Привитые сополимеры сочетают в себе не только свойства составляющих их синтетических (высокие физико-механические характеристики) и природных (биосовместимость, отсутствие токсичности, биоразлагаемость) полимеров, но и в ряде случаев проявляют новые свойства, не характерные для исходных компонентов. Такой вид сополимеров можно применять в основном как биоматериалы, разделительные мембраны и гидрогели.

Реакции синтеза привитых сополимеров подразделяют на три основных типа: «grafting from», «grafting onto» и «grafting-through» (рисунок 2) [67, 68]. В основе первого типа реакций лежит использование полимерного компонента в качестве инициатора, способного возбуждать цепную радикальную, ионную, координационно-ионную или ступенчатую полимеризацию добавляемого в реакционную смесь мономера. Исходный полимерный компонент образует основную цепь привитого сополимера, а полимеризующийся мономер — боковые (привитые) цепи.

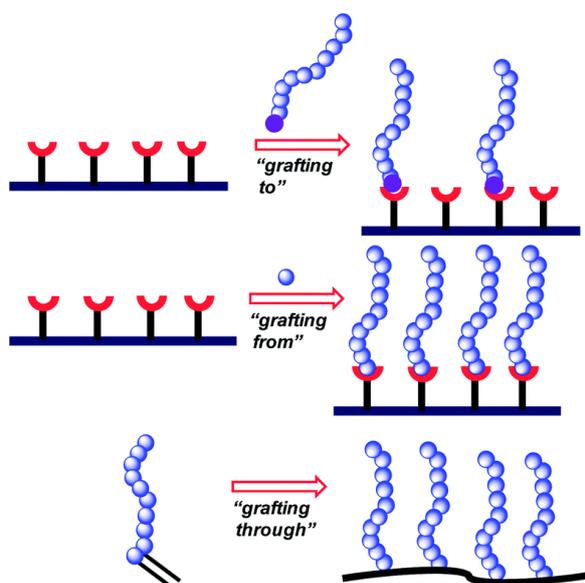


Рисунок 2. Схема направления привитой сополимеризации [68]

Второй тип реакций получения привитых сополимеров «grafting onto» реализуется при обрыве «живых» цепей на «готовом» полимере, при рекомбинации макрорадикалов, полученных в результате γ -облучения или механического воздействия на смесь полимеров, при взаимодействии макромолекул, содержащих функциональные группы (с участием или без участия низкомолекулярных бифункциональных соединений, выполняющих роль сшивающего агента).

Третий тип - "grafting through" основан на радикальной сополимеризации мономеров с макромономерами, содержащими (мет)акрилатные функциональные группы.

Синтез производных хитозана проводят в гомогенных и в гетерогенных условиях. Изменяя условия процесса: соотношение реагентов, pH среды, природу инициаторов полимеризации систем, введение растворителей и разбавителей, можно получать продукты с разной эффективностью и степенью прививки мономеров на хитозане, с различным содержанием синтетических гомополимеров в продуктах синтеза. В зависимости от этого будет меняться и комплекс свойств материалов на основе полученных сополимеров (таблица 2).

Таблица 2. Наиболее распространенные системы при получении привитых сополимеров с хитозаном

| Мономеры | Инициаторные системы | Ссылки |
|--|----------------------|---------|
| Метилметакрилат | Реактив Фентона | [69] |
| Метилметакрилат, Акрилонитрил, Винилпирролидон, Метилакрилат, 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислота | $K_2S_2O_8$ | [70-72] |
| Акрилонитрил, N-изопропилакриламид, Винацетат, 4-винилпиридин, акриловая кислота, метакриловая кислота, N,N"-диметил-N-метакрилоксиэтил-N- | Ионы церия (IV) | [73-77] |

| | | |
|---|--------------|------|
| (3-сульфопропил) аммоний | | |
| Акриламид, [2-(Акрилоилокси)этил]триметиламмоний | Ультрафиолет | [78] |

Несмотря на то, что существование различных конформационных состояний макромолекул хитозана в зависимости от рН среды известно давно [20, 79-83], данные о влиянии этого фактора на привитую сополимеризацию полисахарида с виниловыми мономерами отсутствует.

В связи с поставленной целью работы – получение композиций на основе хитозана с кровоостанавливающими свойствами - решалась задача модификации полимера для придания ему высокоэффективной впитывающей способности при получении гемостатических гелей, пленок и губок. Эти материалы должны обладать хорошей впитывающей способностью к поглощению крови и экссудата. Хитозан, при всех положительных свойствах, способен лишь ограниченно набухать в водных средах. В связи с этим была выполнена модификация хитозана путем его привитой сополимеризации с гидроксилсодержащим мономером – ГЭМА и привитой и блок-полимеризацией с ВП.

ГЭМА относится к мономерам акрилового ряда, содержащим подвижные атомы водорода. На его основе получают водорастворимые и водонабухающие материалы и гидрогели [84-85]. Полимеры ГЭМА биосовместимы благодаря своим гидрофильным свойствам и низкой токсичности, что и обуславливает их применение в медицине, например, при получении эмболизирующих материалов, которые используют при лечении некоторых новообразований (ишемизация опухолей печени, почки, миоматозных узлов и т. п.). Высокая пористость гидрогелей на основе поли-ГЭМА положительно влияет на совместимость материала с тканями организма и способствует росту соединительной фиброзной ткани в порах гидрогеля, что приводит к устойчивой фиксации в кровеносном сосуде [86]. Сшитые полимеры ГЭМА применяют также при получении материалов для изготовления протезов различных органов, в офтальмологии – в составе контактных линз и при разработке противоожоговых повязок в качестве носителя для доставки лекарственного средства [87, 88].

Известны способы получения привитых сополимеров хитозан-ГЭМА в водном растворе с использованием в качестве инициаторов персульфата аммония [89], тиокарбонатбромата калия [90], ионов церия (IV) [91], динитрилазоизомасляной кислоты, УФ- и γ -облучения [92]. Ниже предложена схема привитой сополимеризации ГЭМА на хитозан.

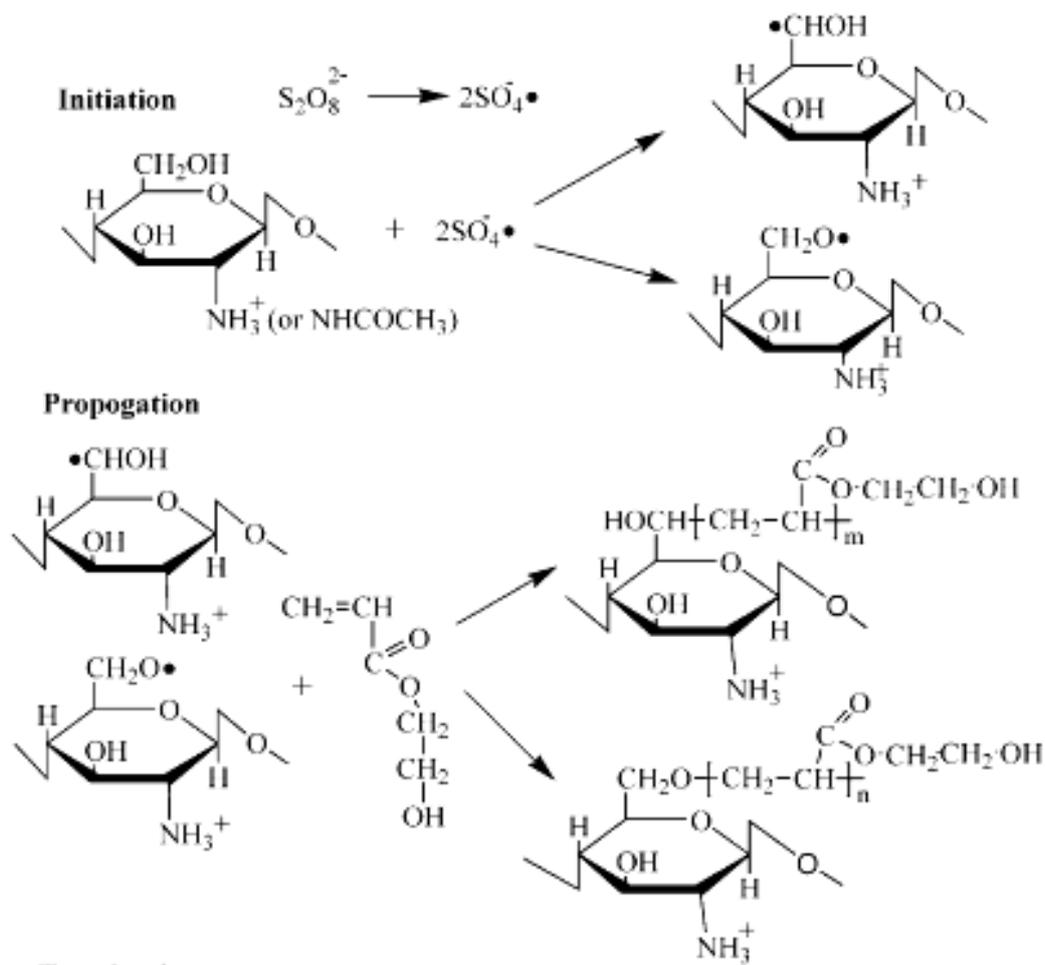


Рисунок 3. Схема привитой полимеризации ГЭМА на хитозан. Инициатор – персульфат аммония [89]

Авторы [89] предполагают, что активные центры на хитозане образуются в результате атаки анион-радикалами метиленовой или гидроксильной групп полисахарида (рисунок 3). На этих центрах начинается полимеризация ГЭМА, протекающая по радикальному механизму. Следует отметить, что существенным недостатком использования перекисных соединений и окислительно-восстановительных систем на их основе является деструкция основной цепи полисахарида [93].

Поэтому важно применение инициаторов, обеспечивающих высокую эффективность привитой полимеризации ГЭМА на хитозан без разрыва цепи полисахарида. Известно, что для этой цели используют соединения Ce^{4+} [94]. Соединения-инициаторы, содержащие ионы Ce^{4+} , в литературе известны [73, 95, 96]. Тем не менее, интересно, что авторы описывают схему инициирования полимера по-разному.

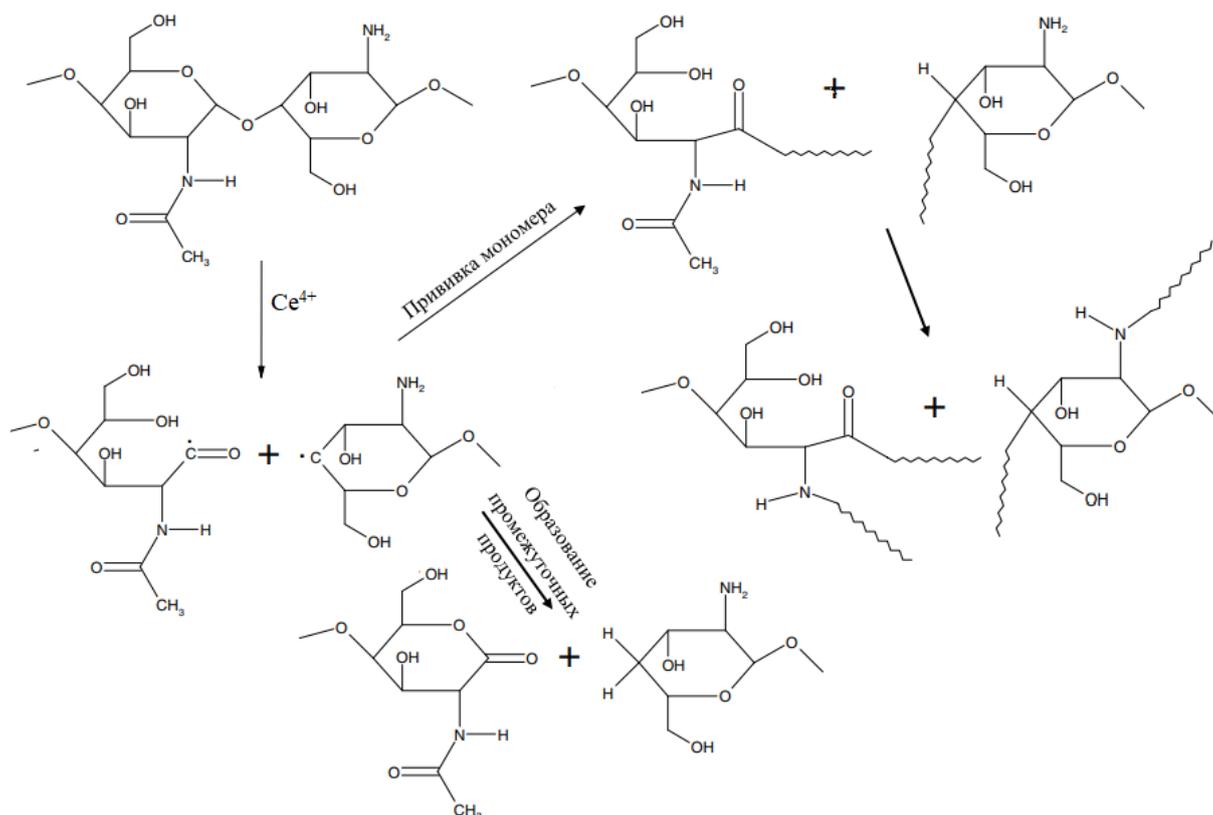


Рисунок 4. Схема механизма привитой полимеризации на хитозан с инициатором - ионами церия

Авторы работы [95] предполагают механизм прививки, который протекает через окисление и цепное расщепление хитозана (рисунок 4).

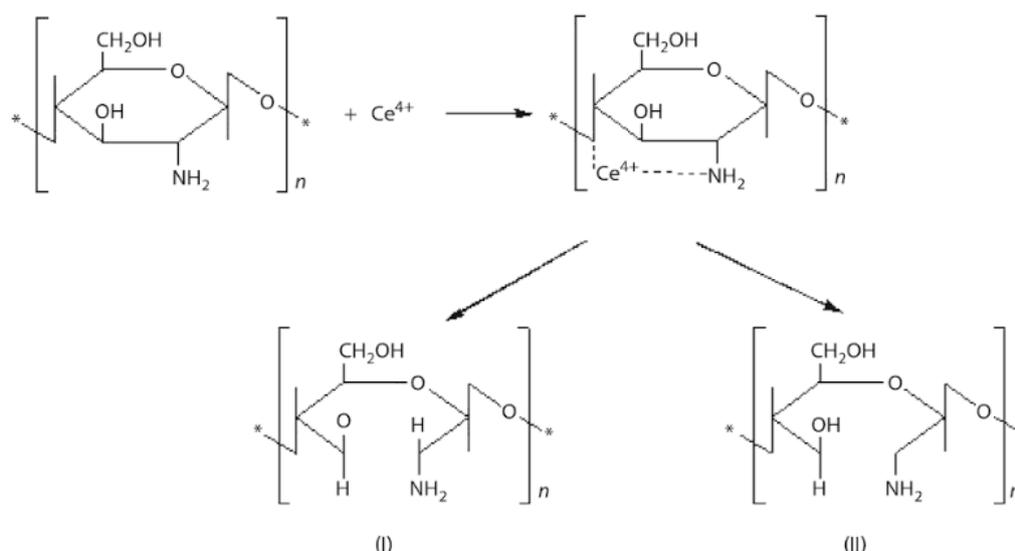


Рисунок 5. Механизм иницирования хитозана ионами церия

Авторы работы [96] не исключают участие как аминогрупп хитозана, так и гидроксильных в процессе полимеризации на хитозан виниловых мономеров (рисунок 5). Но степень прививки при сополимеризации в этом случае обычно не превышает 71%.

Соединения-инициаторы, содержащие ионы Co^{3+} , при привитой полимеризации мономеров на хитозан не столь распространены [65]. Предполагаемая схема образования радикала на цепи хитозана представлена на рисунке 6.

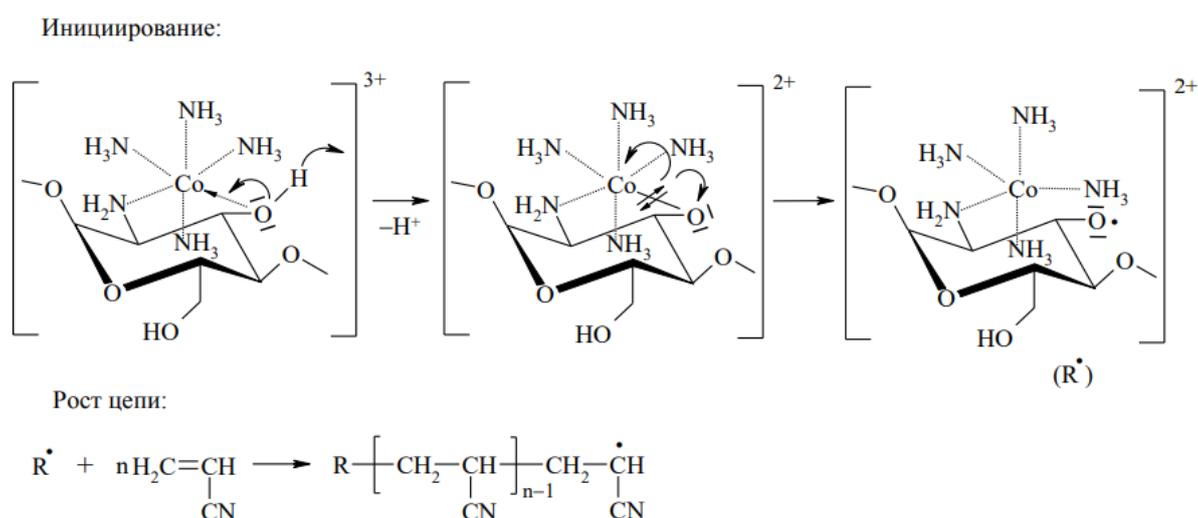


Рисунок 6. Предполагаемая схема образования радикала на цепи хитозана при иницировании полисахарида ионами Co^{3+}

В нашей работе была изучена кинетика привитой полимеризации ГЭМА на хитозан с использованием в качестве иницирующих систем: сульфата церия (IV), хлорида гексаамминкобальта (III), гексанитрокобальтата (III) натрия при различных конформационных состояниях полисахарида, и выявлены оптимальные условия, исключаящие этот недостаток.

ВП также вызывает большой интерес при использовании его для модификации хитозана, поскольку полимеры на его основе обладают уникальным сочетанием физико-химических свойств (биосовместимость, нетоксичность, химическая стабильность, хорошая растворимость в воде и многих органических растворителях) и относятся к нейтральным с неспецифической активностью, то есть их физиологическая активность обусловлена физико-химическими свойствами самого полимера (молекулярной массой, молекулярно-массовым распределением) [97]. ПВП незначительно взаимодействует со структурными элементами организма и, прежде всего, с клеточными мембранами и биополимерами. Благодаря своей структуре, высокой полярности и способности принимать протоны ПВП является сшиваемым и образует химические комплексы, а также является физиологически инертным и гемосовместимым. ПВП используется в качестве биоматериала во многих медицинских направлениях, фармацевтической промышленности, в составе мембран, клея, керамики, бумаги, покрытий и чернил, для бытовых и промышленных приложений, фотографии, волокон и текстиля. Благодаря своей превосходной биосовместимости и способности формировать стабильные ассоциаты и комплексы со многими активными веществами, он нашел свое применение в качестве как заменителя плазмы крови, так и в производстве лекарств - в различных видах таблеток, гранул, мягких желатиновых капсул, гелей, гидрогелей, пленок и покрытий, мембран и нановолокон, пероральных или инъекционных растворах, покрытий для медицинских устройств, контактных линз и многое другое.

Блок-полимеризация.

Блок-сополимеризация осуществляется за счет концевых функциональных групп, при помощи деструкции, введения на конце полимерной цепи групп,

способных к радикальному распаду, реакции передачи цепи и т.д [98]. Блок-сополимеры представляют собой особый класс сополимеров, в которых химически различные мономерные единицы сгруппированы в дискретные блоки вдоль полимерной цепи. Рисунок 7 иллюстрирует несколько из многих архитектур таких сополимеров, которые могут быть сконфигурированы в линейные, разветвленные (трансплантаты и звезда) и циклические молекулярные архитектуры.

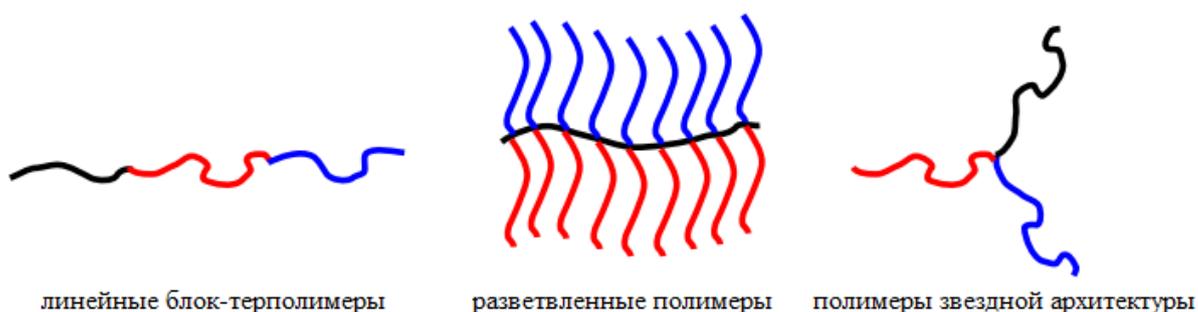


Рисунок 7. Различные архитектуры блок-сополимеров

Методы блок-сополимеризации, как и привитой, позволяют увеличивать гидрофобность слишком гидрофильных материалов или наоборот, повышать физико-механические свойства материалов, улучшать их растворимость или адгезию, модифицировать природные полимеры и соединять их друг с другом, то есть получать полимеры с заранее заданными свойствами.

Сополимеры хитозана с ВП чаще всего получают методами привитой полимеризации, сшивки или путем смешения [99-102]. Получение сополимеров хитозан-ПВП методом блок-сополимеризации начала развиваться не так давно.

Как уже отмечалось выше, при разработке новых материалов функционального назначения, в данном случае – композиционных материалов, использующихся для остановки кровотечений и ранозаживления, актуально придание им бактерицидных свойств. В качестве бактерицидных агентов перспективно использовать НЧ серебра.

1.2. Наночастицы серебра. Методы их получения, стабилизации и их биологические свойства

В современном мире растущую проблему представляет собой увеличение количества инфекций из-за множества болезнетворных микроорганизмов, стойких к антибиотикам [103]. Для решения данной проблемы необходимо искать альтернативные методы лечения болезней, развивающихся от микроорганизмов, стойких к воздействию используемых антибиотиков.

Лечебные свойства ионного серебра известны на протяжении 2000 лет. Установлено, что в зависимости от дозы, серебро может как стимулировать, так и подавлять фагоцитоз. Под влиянием ионного серебра повышается количество иммуноглобулинов классов А, М, G, ионы повреждают мембраны и уменьшают клеточную функцию клеток печени человека [104]. Ионы серебра и соединения на его основе обладают высокой токсичностью по отношению к микроорганизмам, которые включают 16 основных видов бактерий [105, 106].

Однако цитотоксические свойства ионов серебра подавляют рост микроорганизмов, что может привести к снижению жизнеспособности и пролиферативной активности клеток. Применение НЧ серебра, обладающих большой удельной поверхностью, позволяет во много раз увеличить область их контакта с бактериями или вирусами и уменьшить концентрацию препарата, значительно улучшая их бактерицидность и снижая токсичность по сравнению с действием ионного серебра [107].

В биомедицине НЧ серебра находят применение в качестве эффективных бактерицидных агентов против патогенных лекарственно-устойчивых бактерий и используются в составе раневых повязок, мазей, стоматологических материалов, противоопухолевых агентов, покрытий имплантантов и других медицинских изделий [108-111]. Благодаря эффективному антимикробному действию, серебро-содержащие композиции используются в текстильной промышленности, в пищевых добавках, в составе упаковочных материалов [112].

НЧ серебра считаются особенно интересными для производства нового класса антибактериальных препаратов и материалов из-за известного

противомикробного действия от грамположительных и грамотрицательных бактерий [113-120].

Одним из актуальных направлений последнего времени является введение НЧ серебра в раневые повязки и медицинские покрытия для предотвращения микробного роста в ранах и ускорения времени их заживления [121]. Например, у биологически активной мембраны гидрогеля хитозана, модифицированного лактозой с добавлением аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя, с включениями НЧ серебра $d \sim 20$ нм обнаружен синергетический эффект композиции, проявляющийся в уменьшении роста *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* и разрушении биопленок бактерий [122].

Авторы [123] показали, что применение наносеребра, стабилизированного поверхностно-активным веществом и тетраметилэтилендиамином, для покрытия катетеров предупреждает образование биопленок с положительными результатами против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Существенно, что в органах экспериментальных животных, в которые внедрились катетеры, не обнаружено накопления серебра. В настоящее время клинические испытания проходят медицинские устройства и хирургические маски [124], покрытые НЧ серебра [125].

Исследования показывают, что бактерицидность НЧ серебра зависит от их концентрации, размера и формы. Авторы [126] изучили бактерицидный эффект НЧ со сферическими, палочкообразными и треугольными формами против *E. coli*. Они доказали, что качественно более эффективной проявляет себя треугольная форма.

За последние годы разработаны как физические, так и химические способы получения НЧ серебра в различных средах (вода, полярные и неполярные растворители). При этом высокая химическая активность синтезируемых НЧ, наряду с их способностью к самопроизвольной агрегации с потерей оптических, каталитических и биологических свойств делают актуальной задачу их

стабилизации. Общие принципы стабилизации НЧ детально описаны в работах авторов [127].

Среди методов стабилизации основными являются:

- матричная изоляция;
- функционализация поверхности НЧ группами или защитными слоями;
- локализация НЧ на поверхности носителей различной природы.

Наиболее распространенным методом является матричная изоляция. В этом случае в качестве матриц используют полимеры различной природы (органические и неорганические полимеры, керамикообразующие полимеры и т.п.). Механизм стабилизации состоит в адсорбции кластеров на поверхности полимера, что делает невозможной их агрегацию. Единственным путем увеличения размеров НЧ является их рост за счет восстановления ионов металла на поверхности адсорбированного кластера.

Среди интенсивно развивающихся методов получения нанокompозитных материалов наиболее привлекательным с позиции доступности и экологической безопасности является метод химического восстановления прекурсоров благородных металлов в водных средах, с одновременным включением образовавшихся НЧ в органические полимерные матрицы, в том числе природных полимеров. Несомненно, присутствие веществ, стабилизирующих НЧ, должно оказывать существенное влияние на механизм формирования НЧ серебра, на их размеры, форму и на комплекс проявляемых ими свойств - оптических, каталитических, электронных, биологических [127-130].

В последние годы рядом авторов обсуждается принцип стабилизации НЧ серебра производными хитозана. Эти полимеры, благодаря хелатообразующим свойствам хитозана, перспективны как высокоэффективные стабилизаторы. В зависимости от природы стабилизатора различные авторы предлагают разнообразные схемы стабилизации НЧ серебра.

Авторы [131] объясняют защитное действие хитозана, модифицированного меркаптопропилтриметоксисиланом, от агрегации НЧ, полученных с использованием цитрата натрия в качестве восстановителя, наличием amino- и

гидроксильных групп в полисахариде, содержащих свободные электронные пары, которые способствуют адсорбции НЧ на полимере. Некоторые исследователи [132] приписывают ключевую роль амино-группам не только в стабилизации НЧ, но и в восстановлении ионов Ag^+ вследствие уменьшения потенциала Ag^+/Ag ($E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}$) способствующему протеканию реакции. Однако отсутствуют экспериментальные доказательства, подтверждающие это предположение.

Авторы [133] предложили схему стабилизации НЧ серебра, полученных в процессе лазерной абляции, хитозаном на основании результатов ИК-спектроскопии. В ИК-спектре наблюдается смещение пиков – 1638 см^{-1} и 3277 см^{-1} в длинноволновую область на 10 и 4 см^{-1} соответственно, отвечающим валентным колебаниям NH_2 - и OH - групп полисахарида (рисунок 8).

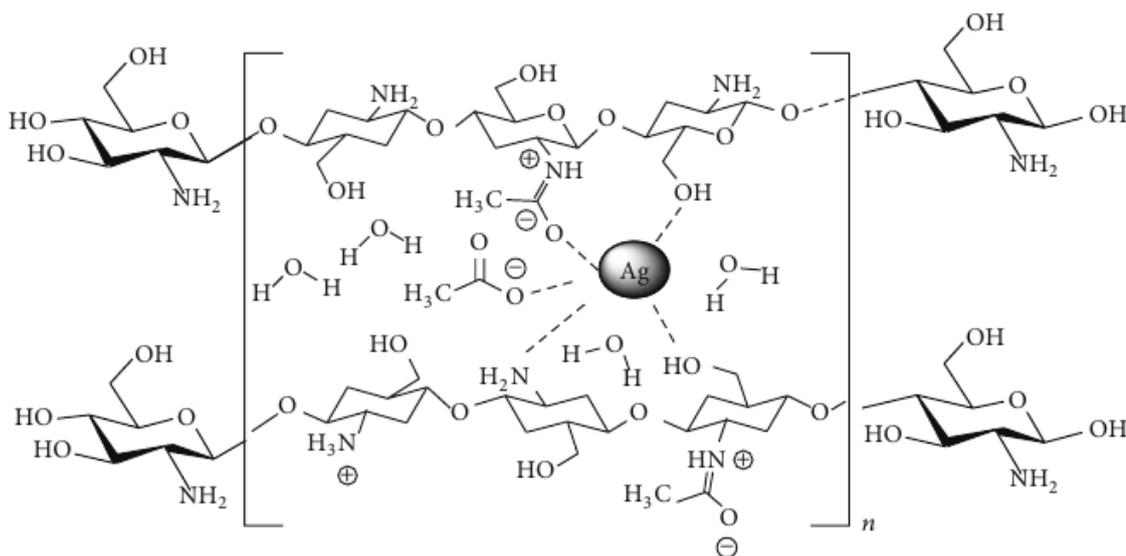


Рисунок 8. Схема стабилизации НЧ серебра функциональными группами хитозана [133]

В работе [131] исследована стабилизация НЧ серебра хитозан-силоксановыми гибридами. Авторы полагают, что она обусловлена формированием комплекса НЧ с хитозаном с участием амино-групп последнего, содержащих свободные электронные пары. В результате молекулы хитозана образуют вокруг НЧ защитный экран, препятствующий агрегации частиц как за счет электростатического, так и за счет структурно-механического факторов. В работе [134], авторы получали НЧ серебра восстановлением ионов Ag^+

борогидридом натрия в растворах хитозана. На основании ИК-Фурье спектроскопии по смещению пиков NH_2 - и OH -групп хитозана они полагают, что стабилизация НЧ серебра происходит в результате взаимодействия, как за счет электростатических, так и Ван-дер-ваальсовых сил отрицательно заряженных функциональных групп хитозана и частично положительно заряженных НЧ металлов (рисунок 9).

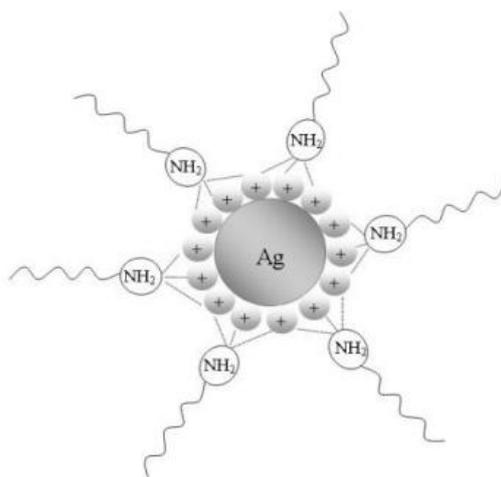


Рисунок 9. Схема стабилизации НЧ серебра макромолекулами хитозана [134]

При стабилизации НЧ серебра хитозаном системные исследования влияния рН раствора, концентрации прекурсора и хитозана, а также ММ стабилизатора на размерные характеристики НЧ серебра ограничены. В отдельных публикациях можно встретить исследование свойств комплексов производных хитозана с НЧ серебра. В работе [137] анализируется влияние концентрации карбоксиметилхитозана, выступающего в качестве восстанавливающего и стабилизирующего агента, прекурсора AgNO_3 и рН среды на размер и количество формирующихся НЧ серебра. Авторы отмечают, что с уменьшением значения рН среды соответственно уменьшается размер НЧ, а максимум полосы плазмонного поглощения смещается в коротковолновую область.

В работе [126] авторы получают НЧ серебра различной формы путем восстановления соли серебра борогидридным, цитратным методами, а также жидкофазным методом с использованием системы гексадецил бромид триметил-аммония – аскорбиновая кислота, и изучают эффективность антибактериальных свойств препаратов серебра. Наибольший бактерицидный эффект по отношению

к E. Coli проявляют НЧ треугольной формы, т.к. она дает большой положительный заряд.

Несмотря на многочисленные исследования по изучению разнообразных композиций, содержащих НЧ серебра, большинство их посвящено изучению их оптических и бактерицидных свойств и определению размера и формы при получении НЧ методами с использованием дополнительных восстановителей или в процессе лазерной абляции.

На нашей кафедре разработан оригинальный метод получения НЧ золота путем УФ-индуцированного восстановления прекурсора – HAuCl_4 – в полимерных матрицах различной природы без введения дополнительных восстановителей. Этот метод может быть отнесен к «green» методам, поскольку он не требует дополнительной очистки композиции. НЧ золота формируются непосредственно в матрице полимера. Последний, как стабилизатор, обеспечивает высокую агрегативную устойчивость НЧ золота в водных дисперсиях. В данной работе этот метод был использован при получении НЧ серебра.

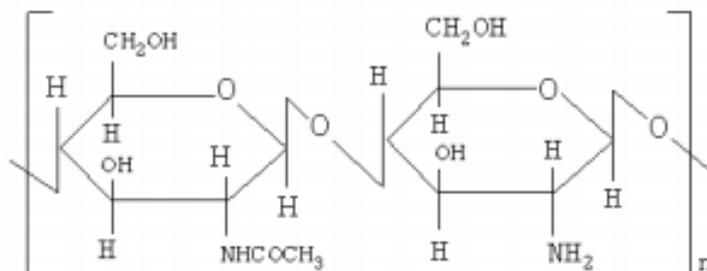
Свойства НЧ серебра, полученных «green» методами, остаются малоизученными. Практически неизученными остаются теплофизические и физико-механические свойства композиций, которые являются необходимыми в свете их практического приложения, в том числе в составе лекарств для адресной доставки. Также не изучено влияние НЧ серебра на размеры макромолекул стабилизатора в дисперсиях, поскольку это определяет надмолекулярную структуру при получении твердотельных образцов.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Используемые вещества и их характеристики

В работе использовали:

1. Хитозан - поли((1,4)-2-амино-2-дезоксид)-β-D-глюкоза, без дополнительной очистки, полученный из панцирей краба (ОАО «Биопрогресс», г. Москва, Россия), со структурной формулой:



и различной ММ:

1) $0,40 \times 10^5$, СД = 0,80,

2) $0,83 \times 10^5$, СД = 0,78,

3) $1,10 \times 10^5$, СД = 0,82,

4) $1,27 \times 10^5$, СД = 0,83,

5) $1,65 \times 10^5$, СД = 0,79,

6) $2,20 \times 10^5$, СД = 0,82,

7) $2,40 \times 10^5$, СД = 0,80.

Массовая доля минеральных веществ в хитозане не превышала 0.1%, влаги – 6%, нерастворимых веществ – 0.1%.

Для приготовления растворов хитозана использовали уксусную кислоту марки «ХЧ» ГОСТ 61-75 (99,5%, плотность 1,049 г/см³), соляную кислоту HCl марки «ХЧ» (36,8 мас. % при 20 °С, плотность - 1,19 г/см³), янтарную кислоту марки «ч.д.а.», L-аспарагиновую кислоту «ч.д.а.», никотиновую кислоту «ч.д.а.», аскорбиновую кислоту «ХЧ», бензойную кислоту «ХЧ», молочную кислоту «ХЧ».

2. Нитрат серебра - AgNO₃ - «марки ч.д.а.» (содержание основного вещества - 99,95%), был использован как прекурсор НЧ серебра.

3. Хлорид натрия – NaCl -марки «ч.д.а.» ГОСТ 4233-77 (содержание основного вещества - 99,9%).

4. Альбумин – сывороточный белок высокой степени очистки, фракция V, очищенная от протеаз (ООО SkyGen).

5. При приготовлении кровоостанавливающей композиции на основе хитозана в нее вводили соли кальция: хлорид кальция марки «ХЧ» (ОАО «Мосхимфармпрепараты»), глюконат кальция марки «Ч», глицерофосфат кальция марки «ХЧ».

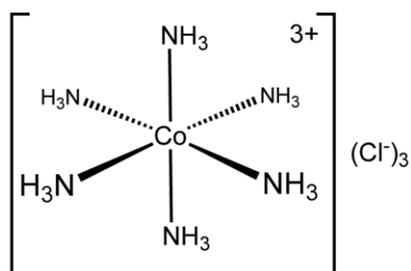
6. Исследовали привитую полимеризацию ГЭМА на хитозан. ГЭМА - прозрачная бесцветная жидкость. Плотность 1.073 г/см³. T_{кип} = 205-208°C. Содержание основного компонента 99,9%, производство «Sigma-Aldrich». Перед использованием мономер подвергали вакуумной перегонке с головкой полной конденсации при пониженном давлении.

7. ВП – ММ = 111 г/моль, содержание основного компонента 99,9%, производство «Sigma-Aldrich».

8. Ферменты для разложения хитозана: амилаза (гликозил-гидролаза) и папаин (цистеиновая протеаза), производство «Sigma-Aldrich».

9. В качестве иницирующих систем при проведении привитой сополимеризации использовали:

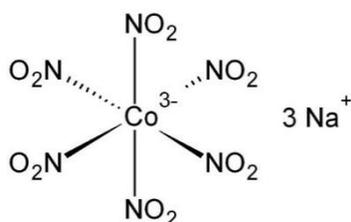
- Хлорид гексаамминкобальта (III) марки «ХЧ» - неорганическое соединение, комплексный аммин соли кобальта и соляной кислоты с формулой $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, красно-коричневые кристаллы, растворимые в холодной воде. Молярная масса 267,48 г/моль. Плотность 1,7016 г/см³. Растворимость в воде 6,95²⁰; 12,04⁵⁰ г/100 мл.



- Сульфат церия (IV) четырехводный – желто-оранжевые кристаллы. Химическая формула $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Молярная масса 404.304 г/моль. Плотность 3,91 г/см³. Растворим в небольших количествах воды, в разбавленной серной,

азотной кислотах, гидролизуется в большом количестве воды (20 °С) 9,84 г/100 мл.

- Гексанитрокобальтат (III) натрия $\frac{1}{2}$ водный - неорганическое соединение, комплексное соединение кобальта с формулой $2\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6] \times \text{H}_2\text{O}$, жёлтые кристаллы, растворимые в холодной воде.



Экстракцию гомополимера на аппарате Сокслета проводили изопропиловым спиртом. Изопропиловый спирт ГОСТ 9805-84 (ЗАО «Химреактив»).

10. Кровоостанавливающие губки получали на основе полиола (компонент А) и изоцианата (компонент Б), предоставленными фирмой «АЙС» г. Саров. Реактивы использовали без дополнительной очистки.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Определение молекулярной массы и степени деацетилирования хитозана

ММ хитозана определяли методами вискозиметрии и гель-проникающей хроматографии.

Вискозиметрический метод.

Навеску хитозана (от 0,1 до 0,01 г в зависимости от ММ полимера) растворяли в 30 мл 0,33н раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде. Для подавления полиэлектролитного эффекта, непосредственно перед измерением в раствор хитозана небольшими порциями добавляли NaCl (концентрация соли в растворе 0,3 моль/л). Вязкость раствора хитозана определяли при помощи вискозиметра Уббелодде при температуре 21°С. Средневязкостную ММ рассчитывали по уравнению Марка-Куна-Хаувинка:

$$[\eta] = k \overline{M_v}^\alpha, \quad \text{где } k = 3.41 \times 10^{-5}, \alpha = 1,02 \text{ при } 21^\circ\text{C} [20, 138].$$

Метод гель-проникающей хроматографии.

ММ хитозана определяли, используя его водноуксуснокислые растворы. Хроматографический анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы Shimadzu CTO20A/20AC (Япония) с программным модулем LC-Solutions-GPC с применением колонки Tosoh Bioscience TSKgelG3000SWxl с диаметром пор 5 мкм, детектор - низкотемпературный светорассеивающий детектор ELSD-LT II. Элюентом служил 0.5 М раствор уксусной кислоты. Скорость потока 0.8 мл/мин. Калибровку выполняли, используя узкодисперсные образцы декстрана в диапазоне ММ от 1000 до 410000 Да (Fluca).

Определение СД.

СД – это отношение количества глюкозаминных звеньев к общему числу мономерных звеньев в молекуле полисахарида. СД хитозана определяли потенциометрическим титрованием с использованием рН-метра Mettler Toledo LE902. Навеску хитозана взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,001 г и растворяли в 0,1н растворе HCl, приготовленном из фиксанала. Полученный раствор титровали 0,1 М NaOH, добавлением раствора NaOH по 0,1 мл через каждые 30 секунд к раствору хитозана, при постоянном перемешивании. Количество щелочи, необходимое для титрования связанной с аминогруппами кислоты, определяли из графика зависимости рН раствора от объёма титранта (рисунок 10).

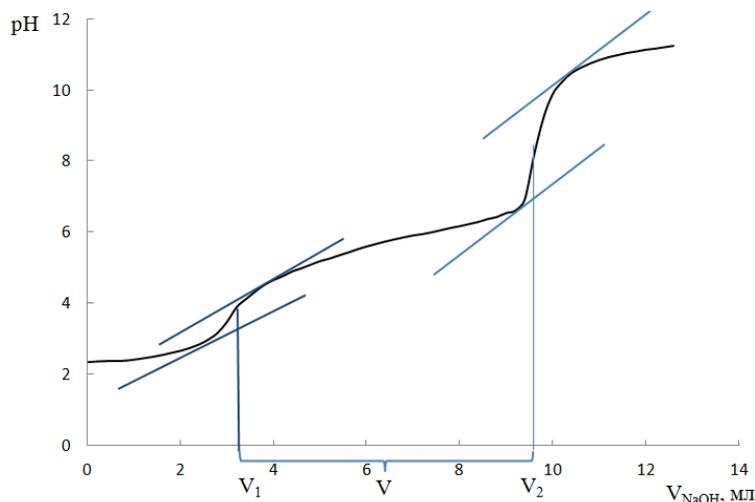


Рисунок 10. Кривая потенциометрического титрования раствора хитозана

Первый перегиб кривой титрования соответствует объему NaOH (титранта), пошедшему на титрование избыточного количества соляной кислоты, а второй – на титрование соляной кислоты, связанной с аминогруппами хитозана. СД образца, в процентах, вычисляли по формуле:

$$\text{СД} = \frac{V_{\text{прак}}}{V_{\text{теор}}} \times 100 \%$$

$$V_{\text{прак}} = V \times C \times 10^{-3},$$

где V - объем раствора NaOH, мл, соответствующий нейтрализации аминогрупп хитозана, определяемый разностью объемов второго и первого перегибов на кривой потенциометрического титрования;

C – концентрация NaOH, моль/л

$$V_{\text{теор}} = \frac{m}{\text{ММ}},$$

где m – навеска хитозана, г; ММ звена хитозана = 161 г /моль.

За окончательный результат принимали среднее значение результатов трёх параллельных измерений, относительное расхождение между которыми не превышает 2 %.

2.2.2. Определение динамической вязкости растворов хитозана

Динамическую вязкость растворов хитозана измеряли на ротационном вискозиметре Brookfield DV-II+ Pro с использованием шпинделей № 18 и № 31. Точность измерения вязкости составляет $\pm 1,0\%$ верхнего предела диапазона измерения.

Исследовали зависимость динамической вязкости растворов хитозана от ММ полимера, концентрации, температуры и рН среды. Водноуксуснокислые растворы хитозана с различной концентрацией полимера – от 1 до 4 мас. % - были приготовлены в среде с рН от 3,3 до 5,0. Перед измерением растворы выдерживали 48 часов.

Кажущуюся энергию активации вязкого течения раствора (ΔE_a , кДж/моль) рассчитывали по уравнению Аррениуса – Френкеля – Эйринга:

$$\eta = A \cdot \exp \cdot \left(\frac{\Delta E_a}{RT} \right)$$

где A – константа, R – универсальная газовая постоянная (Дж/моль×К), T – температура (К), $\eta = \eta_{\max}$.

2.2.3. Определение конформационных переходов хитозана спектрофотометрическим методом

Подтверждение конформационных переходов хитозана осуществляли спектрофотометрическим методом. Для этого готовили водные 0,3 мас. % растворы хитозана в соляной кислоте с ММ полимера $2,2 \times 10^5$ и $1,0 \times 10^5$. Снимали показания рН-метра Mettler Toledo LE902 в диапазоне значений рН среды 3,3 – 6,0 и регистрировали спектры пропускания растворов на спектрофотометре УФ- и видимого диапазонов UV-1650 (Shimadzu), по мере добавления в него некоторого количества 2,5% раствора NaOH.

2.2.4. Синтез привитых сополимеров хитозана.

Привитую сополимеризацию ГЭМА (ВП) на хитозан проводили в трехгорлой круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником, помещенной в термостат с регулируемой температурой, при непрерывном перемешивании. Концентрация хитозана в водноуксуснокислых растворах во всех опытах составляла 3 мас. %, рН среды ~ 4,8 и 3,3, температура реакции 60°C. ГЭМА (ВП) вводили в систему после установления температуры в реакторе. Соотношение [мономер]/[глюкозамин] составляло 1,2, 2,4, 4,8 моль/(осново-моль) соответственно. В качестве иницирующих систем использовали: сульфат церия (IV), хлорид гексаамминкобальта (III), гексанитрокобальтат (III) натрия. Систему выдерживали 15 минут, для установления необходимой температуры раствора и вносили навеску инициатора. Во всех случаях концентрация инициатора составляла 5×10^{-3} моль/л. Синтез проводили в течение 2 часов. Затем температуру в термостате поднимали до 80 °С и 30 минут выдерживали систему для полного завершения процесса полимеризации ГЭМА (ВП). В процессе синтеза через определенные промежутки времени отбирали пробы, осаждали их

изопропиловым спиртом и центрифугировали для отделения осадка. Глубину превращения ГЭМА (ВП) определяли по результатам анализа остаточного мономера методом газовой хроматографии. Определение концентрации остаточного мономера проводили на газовом хроматографе GCMS-QP2010, Shimadzu с детектором по теплопроводности и системой компьютерной регистрации. Колонка: Equity-1 (длина - 30 м, диаметр - 0,25 мм, размер сорбента - 0,25 мкм), газ-носитель: гелий He. Скорость потока газа-носителя в колонке 1 мл/мин, температура колонки для определения ГЭМА (ВП) – 230°C.

Образование привитых сополимеров ГЭМА (ВП) с хитозаном доказывали методом ИК - спектроскопии (спектрофотометр “Perkin-Elmer”). Для анализа использовали образцы продуктов реакции, из которых на аппарате Сокслета экстракцией удаляли гомополимер поли-ГЭМА (ПВП). Экстракцию проводили изопропиловым спиртом в течение 36 ч. Время было установлено по глухому опыту экстракции поли-ГЭМА (ПВП) из механической смеси соответствующих гомополимеров. Затем образцы сушили вакуумированием до постоянной массы.

После экстракции определяли эффективность (отношение массы привитого полимера к массе всего заполимеризовавшегося мономера) и степени прививки (отношение массы привитого полимера к массе хитозана) ГЭМА (ВП) на хитозан.

Степень прививки (СП) рассчитывали по формуле:

$$СП = \frac{m(\text{прив. полимера}) - m(\text{ХТЗ})}{m(\text{ХТЗ})} \times 100$$

Эффективность прививки (ЭП) рассчитывали по формуле:

$$ЭП = \frac{m(\text{прив. полимера}) - m(\text{ХТЗ})}{m(\text{прив. полимера}) - m(\text{ХТЗ}) + m(\text{гомополимера})} \times 100$$

где $m(\text{прив. полимера})$ – масса сополимера в пробе, $m(\text{ХТЗ})$ – масса хитозана в пробе, $m(\text{гомополимера})$ – масса гомополимера, экстрагированного из пробы.

Молекулярную массу сополимеров определяли методом ГПХ по методике, описанной выше.

2.2.5. Синтез блок-сополимеров хитозана с N-винилпирролидоном

Блок-сополимеры хитозана с ВП получали при УЗ-обработке растворов смесей гомополимеров в течение 30 мин с помощью установки И100-6/4 с ультразвуковым генератором И-10-2.0 мощностью 2000 Вт и рабочей частотой $22 \pm 10\%$ кГц.

Для исследования структуры полученного блок-сополимера проводили ферментативное разложение цепей хитозана амилазой и папаином. В раствор блок-сополимера (хитозана) вводили 1 мас. % фермента при температуре среды 38 °С и оставляли на 6 часов для полного расщепления блоков полисахарида. Для полного удаления фермента из раствора, его грели при температуре 55 °С в течение 3 часов.

2.2.6. Изучение комплексообразования хитозана с альбумином и ионами кальция

Изучение взаимодействия хитозана с белковыми молекулами проводили спектрофотометрическим методом по стандартной методике [139]. Спектрофотометрический метод основан на способности белков частично поглощать ультрафиолетовый свет с длиной волны 280 нм, хотя максимум абсорбции ультрафиолетового светового потока приходится на 260 нм. К солянокислому раствору 3 мас. % хитозана приливали водный раствор альбумина с концентрацией $\approx 1,6$ г/л. Комплексообразование белка с хитозаном контролировали во времени по изменению оптической плотности на двух длинах волн - 260 и 280 нм каждые 45 с. Содержание белка (мг/мл) рассчитывали по формуле Калькара [139]:

$$C(\text{г/л}) = 1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}.$$

Изучение образования комплексов хитозан- Ca^{2+} проводили методами ИК-спектроскопии (спектрофотометр “Perkin-Elmer”). Размер комплексов полимер-ион в сверхразбавленных растворах хитозана определяли методом DLS на анализаторе размеров частиц и дзета-потенциала NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments Corporation, США).

2.2.7. Исследование общего времени свертывания крови

Исследование общего времени свертывания крови проводили в опытах *in vitro* и *in vivo* на экспериментальных животных. Все опыты выполнены под руководством и при непосредственном участии д.б.н., профессора А.С. Корягина на кафедре биохимии и физиологии института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского.

Испытания в опытах in vitro.

Для опытов готовили водные растворы хитозана 3 мас. % в различных кислотах с концентрациями ионов кальция от 5 до 100 ммоль/л. Для исследований брали кровь беспородных самок крыс. Общее время свертывания цельной крови при добавлении в нее растворов хитозана исследовали на гемокоагулографе N-331. Для этого отбирали у экспериментальных животных несколько капель крови из подъязычной вены в кювету и приливали 100 мкл исследуемого раствора хитозана – далее снимали показания прибора. Параллельно проводили контрольные опыты по влиянию на свертываемость крови индивидуальных компонентов.

Испытания в опытах in vivo.

На основании опытов *in vitro* были выбраны оптимальные соотношения компонентов для испытаний полученного средства *in vivo*.

Исследование кровоостанавливающих свойств различных композиций хитозана, содержащих ионы кальция, в опытах *in vivo* проводили на предварительно наркотизированных лабораторных животных – нелинейных белых крысах массой ~ 200-220 г. В качестве наркоза использовали диэтиловый эфир.

Во всех опытах применялась следующая методика эксперимента. Испытание кровоостанавливающих композиций различного состава выполнялось на 5 наркотизированных животных. У каждого из них препарировали кожный лоскут с левого бедра размером примерно 2x2 см, обнажая бедренные вену и артерию, надрезали их скальпелем. Сразу после начала кровотечения на рану

наносили композицию и по секундомеру засекали время до полной его остановки (образования тромба).

2.2.8. Получение кровоостанавливающих губок

Кровоостанавливающие губки получали путем введения привитого сополимера хитозан-ГЭМА в полиол и изоцианат. Компоненты загружали в определенной последовательности в плотный пакет, тщательно перемешивали в течение 15 секунд и заливали получившуюся смесь на лавсановую подложку. Концентрации компонентов подбирали таким образом, чтобы были получены губки, обладающие мягкостью, наибольшей эффективной впитывающей способностью, по сравнению с исходной пенополиуретановой губкой. Время гелеобразования составило 65-90 секунд. Впитывающую способность кровоостанавливающей губки проверяли по поглощению ей физиологического раствора (0,9% раствор NaCl), находящегося в контакте с губкой. Для визуализации процесса раствор окрашивали бриллиантовым зеленым. Губку погружали в раствор на 5 мм. Через определенные промежутки времени наблюдали на какую высоту поднимается уровень жидкости и рассчитывали скорость процесса. Выполнено сопоставление результатов с полиуретановой губкой «Сарэл». Степень набухания губки рассчитывали по формуле:

$$\alpha = \frac{m - m_0}{m_0} \times 100\%,$$

где m – масса набухшей губки, m_0 – масса сухой губки.

Структуру и размер пор губки исследовали с помощью микроскопа LevenhukDTX 30 DigitalMicroscope.

2.2.9. Получение наночастиц серебра, исследование размерных характеристик частиц в дисперсиях

Изучение кинетики формирования НЧ серебра в растворах хитозана.

Готовили водный раствор 1 мас. % AgNO_3 . В 2 мас. % водноуксуснокислый раствор хитозана приливали аликвотное количество раствора AgNO_3 , создавая нужную концентрацию ионов серебра. Полученный раствор, закрытый кварцевым

стеклом, облучали УФ-лампой мощностью 1600 мВт/м^2 (расстояние от лампы до стола было всегда фиксированным - 27-29 см). Толщина слоя раствора не превышала 5 см – глубину проникновения УФ-лучей. Температура реакционной смеси составила $\sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$. О восстановлении ионов серебра и формировании НЧ судили по появлению и нарастанию полос плазмонного поглощения в области длин волн $\lambda \sim 380\text{-}480 \text{ нм}$, характерных для НЧ серебра. Возникновение полосы поверхностно-плазмонного резонанса - результат взаимодействия падающего на поверхность НЧ света с электронами проводимости металлов [140]. Каждые 20 минут регистрировали спектры поглощения разбавленного в 10 раз раствора на спектрофотометре УФ- и видимого диапазонов UV-1650 (Shimadzu), до тех пор, пока величина максимума полос плазмонного поглощения не переставала изменяться. Процесс длился ~ 2 часа в зависимости от условий. О полном протекании процесса формирования НЧ серебра и исчерпанию прекурсора AgNO_3 также свидетельствовало отсутствие помутнения системы при добавлении в нее некоторого количества соляной кислоты.

Во всех опытах процесс формирования НЧ серебра в растворах хитозана проводили по одному алгоритму.

Влияние ММ хитозана на размеры НЧ серебра.

Влияние ММ хитозана на размеры НЧ серебра исследовали двумя методами – спектрофотометрически и методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (РМУ).

Готовили водноуксуснокислые растворы хитозана с ММ от $0,45 \times 10^5$ до $2,4 \times 10^5$ при фиксированной концентрации прекурсора AgNO_3 , которая составляла 2×10^{-3} моль/л.

Снимали спектры абсорбции полученных дисперсий НЧ серебра и определяли максимумы полос плазмонного поглощения дисперсий в области длин волн $\lambda \sim 380\text{-}480 \text{ нм}$.

В работе для измерения размерных характеристик дисперсных частиц использовали два метода.

- Метод РМУ позволяет определить размер самих НЧ. Этот метод успешно используется для изучения коллоидных растворов и высокодисперсных систем различной природы, в которых размеры рассеивающих неоднородностей лежат в интервале от 1 до 100 нм [141].
- Метод DLS основан на светорассеянии всей частицы - НЧ, окруженных стабилизатором. Сочетание этих методов позволяет определить размеры как НЧ, так и охарактеризовать их оболочку-макромолекулу.

Средние размеры НЧ серебра, сформированных в растворах хитозана с $MM = 0.4 \times 10^5$ и 2.4×10^5 и содержанием прекурсора $AgNO_3 = 2 \times 10^{-3}$ моль/л, были определены методом РМУ. Малоугловые рентгенограммы регистрировали с помощью малоугловой камеры КРМ-1 с коллимацией первичного пучка по схеме Кратки, излучение $CuK\alpha$, монохроматизированное Ni-фильтром; интенсивность рассеянного излучения регистрировали в угловом интервале от 5 до 160 угловых минут. Данный метод является неразрушающим и позволяет исследовать образцы в виде тонких пленок (пластинок) или растворов без дополнительной подготовки, в исходном структурном состоянии. Исследуемые наноконпозиты представляют собой двухфазные системы, в которых рассеивающей фазой являются НЧ серебра, стабилизированные полимером.

Размерные характеристики и полидисперсность частиц полимер-НЧ серебра в сверхразбавленных растворах хитозана определяли методом DLS на анализаторе размеров частиц и дзета-потенциала NanoBrookOmni (Brookhaven Instruments Corporation, США). В данном методе определяется коэффициент диффузии частиц дисперсной фазы в жидкости на основании анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. Коэффициент диффузии (D) является важнейшим параметром, измеряемым при исследовании квазиупругого светорассеяния. Размер сферических невзаимодействующих между собой частиц рассчитывается по формуле Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$$

где k_B – константа Больцмана; T – абсолютная температура; η – сдвиговая вязкость среды, в которой взвешены частицы радиуса R .

Полидисперсность - характеристика размеров частиц в дисперсных системах. Дисперсность обратно пропорциональна среднему диаметру частиц и определяется удельной поверхностью, т. е. отношением общей поверхности частиц к единице объёма (или массы) дисперсной фазы.

На анализаторе также измерили скорость потоков жидкости и газа методом динамического рассеяния света в конфигурации лазерного доплеровского анемометра (метод ELS), на основании которых рассчитывается величина электрокинетического (ξ) потенциала частиц дисперсной фазы, являющегося мерой агрегативной устойчивости системы [142].

2.2.10. Исследование устойчивости дисперсий наночастиц серебра

Устойчивость дисперсий НЧ серебра в растворах хитозана оценивали по величине электрокинетического потенциала. Электрокинетический (ξ) потенциал – это потенциал в двойном слое между коллоидной частицей, способной к движению в электрическом поле, и глубиной раствора, где потенциал равен 0. Известно, что критическое значение ξ -потенциала коллоидных частиц, определяющее начало их агрегации, составляет 25-30 мВ [142].

По величине ξ -потенциала судили об устойчивости дисперсий наносеребра в стабилизаторе-хитозане было проведено электрофоретическим методом. НЧ серебра в растворе полимера получали вышеописанным методом, концентрация прекурсора $AgNO_3$ составляла 2×10^{-3} моль/л. Дисперсию НЧ серебра разбавляли в 6 раз с целью снижения вязкости. Электрофорез разбавленных дисперсий проводили на приборе Кёна при разности напряжений между электродами 210 В и силе тока 6,3 мА.

Электрофоретическую подвижность определяли по формуле:

$$U_{эф} = \frac{S * l}{t * U},$$

где U – напряжение, В; t – время от начала перемещения частиц дисперсной фазы к одному из электродов, с; l – расстояние между электродами, м; S – путь, пройденный НЧ, м.

ξ -потенциал рассчитывали по формуле:

$$\xi = \frac{\eta^* U_{эф}}{\varepsilon \varepsilon_0},$$

где ε_0 – электрическая константа, $8,85 \times 10^{-12}$ Ф/м; ε – диэлектрическая проницаемость воды; η – вязкость, Па·с; $U_{эф}$ – электрофоретическая подвижность, $m^2/c \times V$.

2.2.11. Исследование теплофизических свойств композитов

Теплофизические свойства образцов хитозана и его композитов, содержащих НЧ серебра, изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе DSC204F1 Phoenix (Netzsch Gerätebau, Germany). Измерения исследуемых образцов были выполнены в атмосфере аргона при скорости сканирования 5 °С/мин. Температуры стеклования образцов определялись с погрешностью ± 0.5 °С. Перед анализом образцы сушили до постоянной массы под вакуумом в вакуумном шкафу UT-4630V и хранили в эксикаторе.

Термогравиметрический (ТГ) анализ проводили с помощью термомикровесов «Netzsch Gerätebau TG 209 F1» в атмосфере аргона, в области температур 25 – 400°С. Термомикровесы TG 209 F1 позволяют фиксировать изменение массы до ± 0.1 мкг. Скорость нагревания тигля с веществом составляла 5 °С/мин. Методика проведения ТГ-анализа стандартная, согласно Netzsch Software Proteus. За температуру начала разложения принимали температуру, соответствующую потере массы 2 %.

2.2.12. Приготовление пленок из растворов и исследование их физико-механических свойств

Пленки получали методом полива на лавсановую подложку из водноуксуснокислых растворов хитозана и композиций на его основе в условиях

равномерного испарения растворителя до постоянной массы при комнатной температуре. Затем пленки подвергали вакуумированию в течении 4-6 часов при $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в вакуумном шкафу.

Механические свойства пленок (разрывную прочность σ и относительное удлинение ϵ) определяли на разрывной машине ZWIC Z005 (Германия) при скорости растяжения 50 мм/мин.

2.2.13. Исследование структуры нанокompозитов

Структура хитозана и его нанокompозитов была исследована с помощью РФА-анализа образцов на рентгеновском дифрактометре «Bruker D8 Discover», с использованием CuK_α излучения и детектора LynxEye с шагом сканирования 0.02° , в интервале 2θ $10\text{-}60^{\circ}$. Точность определения дифракционных углов (2θ) составляла $\pm 0.02^{\circ}$. Оценку интенсивности дифракционных максимумов проводили по их высоте (100 - бальная шкала).

Топографию поверхности пленок хитозана и его нанокompозитов изучали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на сканирующем зондовом микроскопе Solver P47 (Зеленоград). Сканирование проводили в полуконтактном режиме. Эксперименты выполнены в ИМХ РАН старшим научным сотрудником Батенькиным М.А.

2.2.14. Исследование бактерицидных свойств дисперсий наночастиц серебра, стабилизированных хитозаном

Бактерицидные свойства растворов хитозана, содержащих НЧ серебра были изучены в отделе биологических исследований НИИ химии ННГУ.

В качестве тест культур использовались следующие виды бактерий: *Escherichia coli* (кишечная палочка), *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка), *Staphylococcus aureus* (стафилококк золотистый). Для оценки бактерицидной активности исследуемую композицию помещали на поверхность агаризованной питательной среды. В питательную среду вводились тест-культуры бактерий. О наличии бактерицидной активности судили по зоне ингибирования роста тест-культур бактерий, которая образуется вокруг исследуемых образцов.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Исследование конформационных переходов макромолекул хитозана в водноуксуснокислых растворах

Общим этапом в получении материалов на основе хитозана и его производных является получение растворов полисахарида в водных растворах кислот. В качестве наиболее доступного и распространенного компонента при приготовлении растворов хитозана используют уксусную кислоту.

В работе авторов [20] выполнены обобщенные и теоретические расчеты и показано, что конформационное состояние макромолекул хитозана различно в зависимости от pH среды - клубок до значений pH ~ 3,6; спираль до значений pH ~ 4,8-5,5. Систематические исследования реакций сополимеризации хитозана с ГЭМА и ВП в растворе были выполнены в различных конформационных состояниях макромолекул полисахарида – спирали и клубка. Так как при привитой и блок-сополимеризации использовались различные ММ хитозана, представляется значимым разработать методику надежного определения конкретных условий (ММ, pH) перехода конформационных состояний макромолекул хитозана.

С целью интерпретации особенностей поведения растворов хитозана был выполнен комплекс исследований:

- исследование зависимости динамической вязкости растворов хитозана от значений pH среды
- определение эффективных размеров макромолекул хитозана методом DLS,
- исследование температурных зависимостей динамической вязкости растворов хитозана с макромолекулами в различных конформациях и определение энергии активации вязкого течения растворов полимера,
- исследование оптических свойств растворов хитозана.

На примере образца хитозана с $MM=1,1 \times 10^5$ и СД 0,82 исследовано влияние рН среды на вязкостные свойства умеренно-концентрированных растворов полисахарида (рисунок 11).

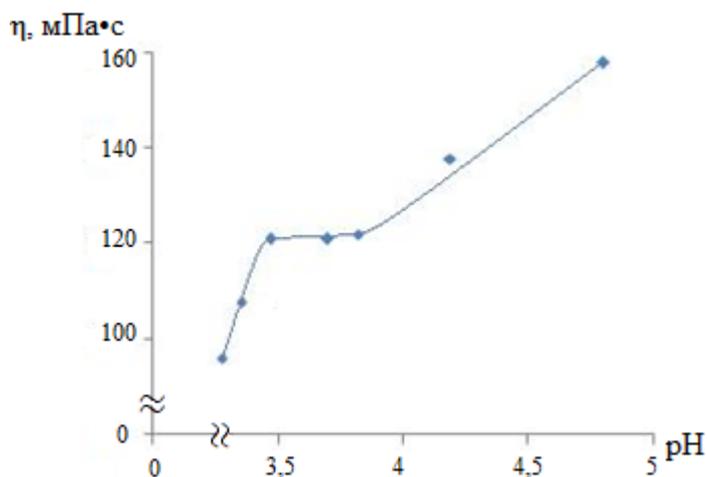


Рисунок 11. Зависимость динамической вязкости 3 мас. % раствора хитозана от рН среды, $MM= 1,1 \times 10^5$, СД = 0,82. $T=25^\circ C$

Наблюдаемая зависимость вязкости раствора хитозана от значений рН среды не является линейной, на кривой имеется три области: при $pH < 3,4$ кривая монотонно возрастает, далее до $pH = 3,8$ переходит в плато, затем вновь следует монотонное возрастание. Можно предположить, что такой характер поведения кривой связан с различным конформационным состоянием макромолекул хитозана: спиральная конформация при $pH=4,8$ и конформация клубка при $pH=3,3-3,5$. Кооперативное разрушение водородных связей внутри макромолекулы при достижении некоторой «критической» степени протонирования приводит к конформационному переходу спираль-клубок. Таким образом, на вязкость растворов полимера существенное влияние оказывает конформационное состояние его макромолекул. Можно предположить, что такой характер кривой связан с различным конформационным состоянием макромолекул хитозана — спиральная при $pH > 4$, конформация клубка при $pH 3,3-3,5$ — и обусловлен изменением размеров макромолекул полимера при изменении рН среды, что подтверждается исследованиями методом DLS.

Методом DLS был определен эффективный диаметр макромолекул хитозана в зависимости от рН среды (таблица 3).

Таблица 3. Эффективный диаметр макромолекул хитозана при различных значениях рН среды. $\omega(\text{ХТЗ}) = 0,03\%$. Полидисперсность $\sim 1,25$

| ММ хитозана | Эффективный диаметр, нм рН=4,8 (конформация– спираль) | Эффективный диаметр, нм рН=3,3 (конформация– клубок) |
|-------------------|---|--|
| $1,1 \times 10^5$ | 623,9 | 536,9 |
| $2,2 \times 10^5$ | 868,9 | 546,5 |

По данным метода DLS макромолекулы хитозана в спиральной конформации, независимо от ММ, характеризуются большим эффективным диаметром, чем в конформации клубка. И таблицы видно, что макромолекулы хитозана с ММ = $1,1 \times 10^5$ при значениях рН среды = 4,8 (спиральная конформация) имеют больший размер (~ 624 нм), чем при значениях рН=3,3 (конформация макромолекул – клубок), эффективный диаметр которых равен 537 нм. Обращает на себя внимание, что с увеличением ММ полимера это различие в размерах существенно возрастает (таблица 3). Следует отметить различное влияние ММ хитозана на размерные характеристики его макромолекул - в конформации клубка макромолекулы с вдвое отличающимися ММ близки по размерам, тогда как в спиральной конформации их размеры отличаются на $\sim 30\%$. В последнем случае нельзя исключить и ассоциацию макромолекул, которая также приводит к завышенному размеру. Однако эксперимент проводился в очень разбавленных растворах хитозана с концентрацией полисахарида не более 0,03 мас. %, когда ассоциацией макромолекул можно пренебречь, а их конформация сохраняется. В этом случае корректно говорить, что фиксируются размеры, обусловленные диффузионным вращением вытянутых цепей полисахарида. Тогда как в конформации клубка диффузионное вращение макромолекулы отражает его реальные размеры, определяемые его радиусом инерции. Соответствующие расчеты радиуса инерции по уравнению Флори-Фокса с использованием значений характеристической вязкости подтверждают последнее предположение.

Существование различных конформационных состояний макромолекул полисахарида при отличающихся значениях рН среды находит подтверждение при изучении температурных зависимостей вязкости умеренно-концентрированных растворов хитозана (рисунок 12).

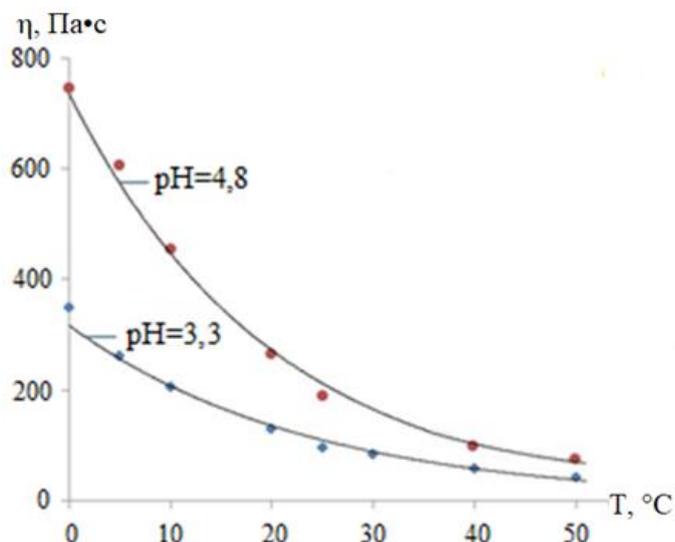


Рисунок 12. Зависимость динамической вязкости растворов от температуры для образцов хитозана с $MM=1,1 \times 10^5$: кривая 1 - спиральная конформация макромолекул; кривая 2 - конформация макромолекул клубок

В области температур от 0 до 30 °C наблюдается существенное различие в вязкости растворов хитозана при одинаковой концентрации полисахарида (3 мас. %) и $MM=1,1 \times 10^5$, но отличающимся конформационным состоянием его макромолекул (рисунок 12). Так при $T = 10$ °C вязкость растворов в спиральной конформации в два раза превышает вязкость растворов с конформацией макромолекул – клубок. Это может быть обусловлено сильным межцепным взаимодействием вытянутых макромолекул в спиральной конформации, и как следствие – повышением сопротивления течению. С ростом температуры вязкость растворов хитозана в обеих системах закономерно уменьшается.

На основании температурной зависимости с использованием уравнения Аррениуса–Френкеля–Эйринга и полулогарифмических координат зависимости вязкости от температуры была рассчитана кажущаяся энергия активации вязкого

течения растворов хитозана для различных конформационных состояний макромолекул (ΔE_1 – спираль, ΔE_2 – клубок) (рисунок 13).

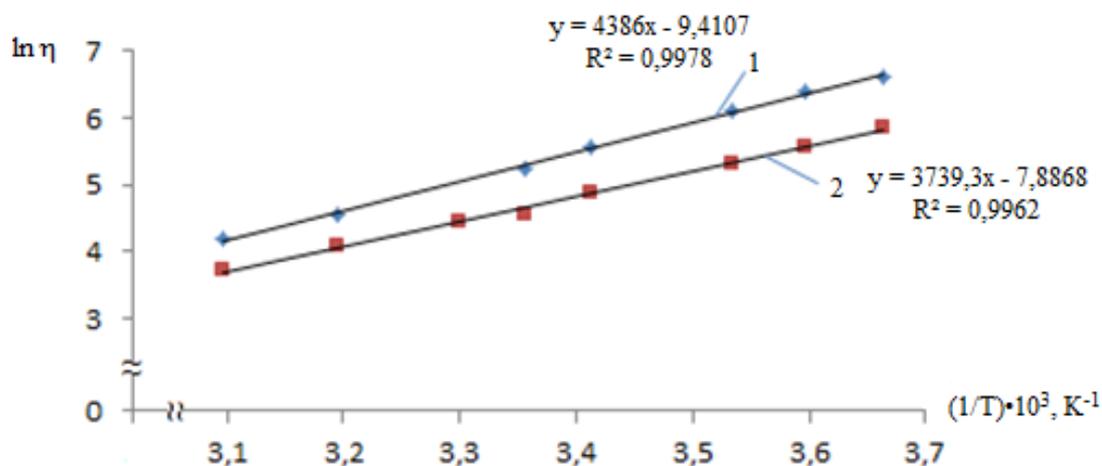


Рисунок 13. Зависимость $\ln \eta$ от $1/T$ для образцов хитозана с $MM = 1,1 \times 10^5$.

1 - pH = 4,8; 2 - pH = 3,3

Кажущаяся энергия активации (ΔE_a) вязкого течения жидкости - это высота некоего потенциального энергетического барьера, который надо преодолеть одному молю частиц для последовательного перескока из одного положения равновесия в другое [143]. Величина ΔE_a является мерой интенсивности межмолекулярного взаимодействия макромолекул в растворах, т.е. косвенной характеристикой прочности структуры полимерных систем в растворах.

Наблюдаемое различие в энергиях активации вязкого течения растворов хитозана составляет:

$$\Delta E_1 = (36,5 \pm 0,4) \text{ кДж/моль} - \text{pH} = 4,8$$

$$\Delta E_2 = (31,1 \pm 0,3) \text{ кДж/моль} - \text{pH} = 3,3.$$

Более высокое значение ΔE_a указывает, что межцепное взаимодействие макромолекул хитозана с участием водородных связей в спиральной конформации более сильное.

Эта тенденция согласуется с литературными данными для других природных полисахаридов и их производных, например, целлюлозы и её эфиров [144]. В области температур ~ 50 °C происходит разрушение ассоциатов макромолекул в спиральной конформации, вязкость в обеих системах становится

примерно одинаковой (кривые сближаются). Сближение значений вязкости в области повышенной температуры может быть обусловлено не только разрушением ассоциатов, но и разрушением водородных связей между звеньями полимерных цепей, что приводит к конформационному переходу спираль-клубок. Следует подчеркнуть, что этот эффект может быть также обусловлен разрушением водородных связей между звеньями полимерных цепей, что приводит к конформационному переходу спираль-клубок. Впервые нами рассмотрена возможность применения спектрофотометрического исследования для изучения конформационных переходов макромолекул хитозана. На рисунке 14 систематически прослеживается четкое снижение светопропускания в области $T = 60-75^{\circ}\text{C}$, по-видимому, обусловленное конформационным переходом спираль-клубок, о котором было сказано выше.

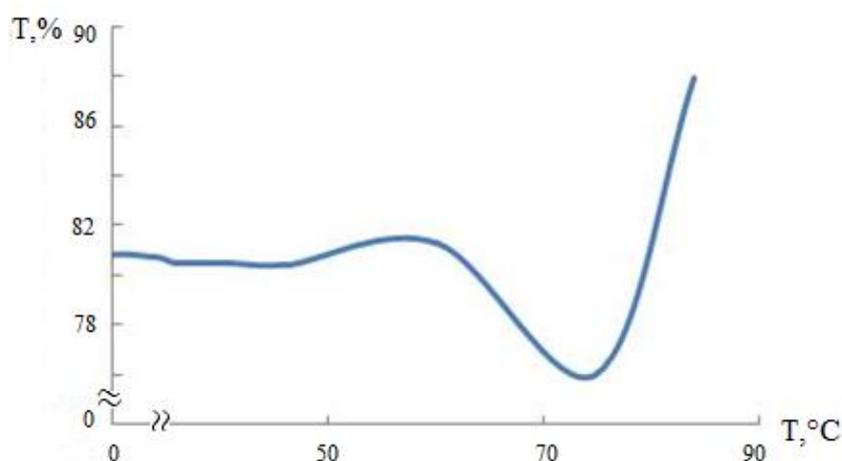


Рисунок 14. Зависимость светопропускания 0,03 мас.% раствора хитозана от температуры. $\text{СД}=0,82$; $\text{ММ}=1,1 \times 10^5$

Были выполнены исследования изменения оптической плотности разбавленных растворов хитозана в широком диапазоне ММ.

Во всех случаях наблюдается резкое изменение процента светопропускания в области значений рН 3,0-3,5, характер кривых одинаковый при одинаковой степени деацетилирования. Типичная картина иллюстрируется на рисунке 15, где приведено изменение оптической плотности для образцов с ММ $2,2 \times 10^5$ и $1,1 \times 10^5$ ($\text{СД} = 0,82$) в зависимости от рН среды.

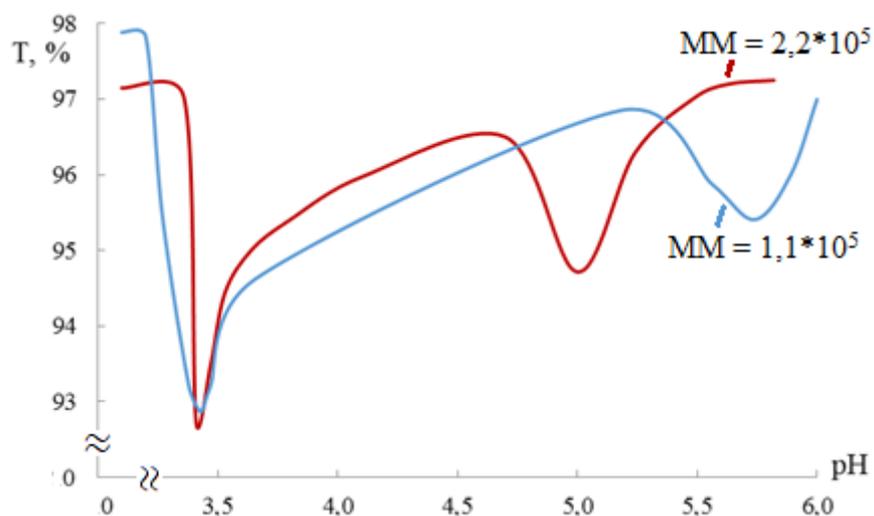


Рисунок 15. Изменение светопропускания 0,03 мас.% растворов хитозана в зависимости от pH среды. СД = 0,82

На кривых (рисунок 15) наблюдается два резких перехода в области значений pH ~ 3,4 и 4,8-6. Наблюдается четкая воспроизводимость результатов в 5 повторностях. Первый минимум, соответствующий значению pH = 3,4 полностью совпадает для обоих значений ММ хитозана. Это значение соответствует той же области pH среды, которое зафиксировано авторами [20] на основе вискозиметрических данных. Но в отличие от результатов авторов, конформационный переход клубок-спираль макромолекул хитозана, установленный нами спектрофотометрически, фиксируется очень четко. После минимума кривая не доходит до исходного значения % светопропускания, что связано, скорее всего, с более интенсивным рассеянием макромолекул в спиральной конформации. Вторым минимумом на кривых можно интерпретировать как конформационный переход спираль-глобула. При незначительном повышении pH среды (выше этого критического значения) наблюдается выпадение осадка, раствор просветляется, и процент светопропускания приближается к значению растворителя. Переход спираль-глобула при приближении к точке pH осаждения полимера различен для хитозана с отличающимися ММ. Для хитозана с $MM = 1,0 \times 10^5$ этот переход соответствует значению $pH = 5,7$, в то время как макромолекулы с в два раза большей ММ коллапсируют уже при $pH = 5,0$. Эти результаты позволяют объяснить

выявленную нами аномалию при изучении вязкостных свойств растворов хитозана. Она заключается в том, что растворы хитозана с более высокой ММ при рН ~ 5,0-5,2 менее вязкие, чем низкомолекулярные. Таким образом, становится понятной причина различной вязкости этих растворов при одинаковой концентрации полимера и рН ~ 5,0.

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

Совокупность полученных результатов позволила четко определить конформационные переходы макромолекул хитозана в области значений рН 3,2-3,3 и 4,8-6 и показать, что взаимодействие макромолекул хитозана с участием водородных связей в спиральной конформации более сильное, чем макромолекул в конформации клубка. Также установлено, что макромолекулы хитозана при значениях рН среды = 4,8 (спиральная конформация) имеют больший размер, чем при значениях рН=3,3 (конформация макромолекул – клубок). Эти данные позволяют получать воспроизводимые по вязкостным свойствам растворы в условиях различных характеристик исследуемого полимера. Следует обратить внимание, что с точки зрения медико-биологического назначения, рН среды должен быть близок к нейтральным значениям - рН кожи (4,5-6) и крови (~7,3). Для достижения последних значений рН при сохранении гомогенности систем без расслоения целесообразно использовать ММ хитозана, не превышающие величины $6,0 \times 10^4$.

В перспективе практического использования растворов хитозана не стоит забывать, что со временем их ММ, а соответственно и вязкость - снижаются. Процесс гидролиза хитозана подтверждали методом гель-проникающей

хроматографии на примере образца с исходной ММ = $2,20 \times 10^5$. Спустя 4 месяца средняя ММ образца уменьшилась на 15% до $1,90 \times 10^5$.

Известно, что кислотный гидролиз хитозана протекает через протонирование гликозидных связей с последующим распадом промежуточного оксониевого иона по мономолекулярному закону и расщеплением крупных макромолекулярных цепей на два меньших (рисунок 16).

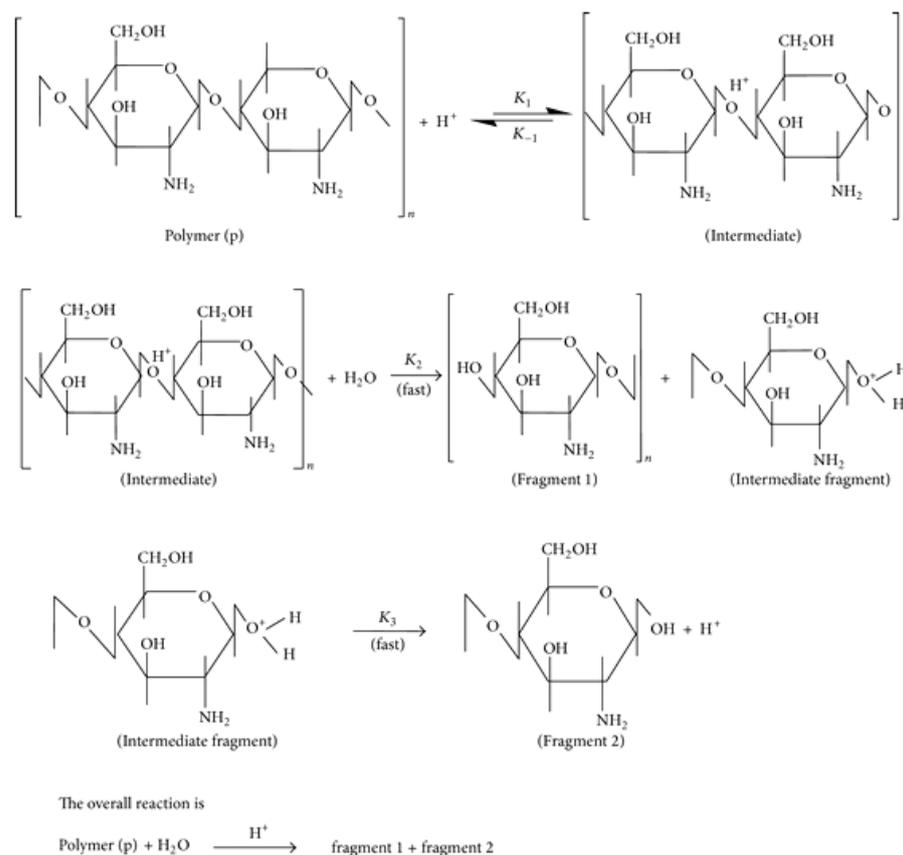


Рисунок 16. Схема кислотного гидролиза хитозана [145]

Таким образом, при приготовлении растворов и гелей на основе хитозана следует рассчитывать время их практического использования или указывать допустимый срок хранения, в процессе которого основные их свойства изменятся незначительно.

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

Свойства хитозана – биосовместимость, биоразлагаемость, отсутствие токсичности, определяют перспективу создания и использования на его основе новых материалов в медицине и биотехнологии. Однако существует несколько факторов, ограничивающих его применение напрямую в нативной форме. Во-первых, хитозан растворяется только в водных растворах кислот, имеющих значение рН среды $\geq 1,5$, а верхняя граница будет определяться ММ и может достигать значений от 5 до 6, а олигомеров - 7. Во-вторых, природная хрупкость и низкое влагопоглощение полисахарида также диктует необходимость модификации хитозана для получения биосовместимых водорастворимых или набухающих в нейтральных средах продуктов. Решение этих двух проблем может быть достигнуто путем модификации хитозана. В свете решения частной задачи – создания кровоостанавливающих и ранозаживляющих композиций, это позволит расширить спектр их назначения– как для наружного, так и для внутреннего применения.

3.2.1. Синтез привитых и блок сополимеров

Модификацию хитозана проводили путем привитой и блок-сополимеризации с двумя мономерами – ГЭМА и ВП. Полимеры ГЭМА и ВП, благодаря своим гидрофильным свойствам и низкой токсичности, обладают хорошей биосовместимостью и используются в медицине [85, 88, 97]. Модификация хитозана ВП путем сополимеризации может обеспечить получение водорастворимых (набухающих) гибридных продуктов или гелей.

В процессе исследования изучали влияние на сополимеризацию

- природы иницирующей системы,
- соотношения компонентов,
- конформации хитозана (значений рН среды).

Хитозан является жесткоцепным полиэлектролитом. Такого рода полимеры склонны к межмакромолекулярным взаимодействиям, конформационным превращениям, имеют тенденцию к образованию агрегатов [81]. Персистентная длина макромолекул полисахарида, определенная экспериментально различными методами для различных образцов хитозана, уменьшается с 81 нм до 32 нм с увеличением ионной силы раствора, и достигает расчетной величины 24 нм в θ -условиях. Максимальная величина сегмента Куна молекул хитозана, наиболее часто используемого в научных и практических целях, составляет 48 нм. Хитозан растворяется только при рН среды ($\text{pH} < 5,5$), поэтому его аминогруппы существуют преимущественно протонированной форме, а его макромолекулы, имея полугибкую высокозаряженную поликатионную цепь, характеризуется либо конформацией жесткого стержня, либо клубка [80, 82, 83].

При выборе значений рН раствора при проведении синтеза преследовали цель исследовать влияние конформационных состояний макромолекул хитозана как на полимеризацию, так и на свойства продуктов, поэтому использовали две конформации полисахарида – спиральную (рН среды $\sim 4,8$) и клубка (рН среды $\sim 3,3$). В качестве иницирующих систем при привитой полимеризации ГЭМА на хитозан использовали: сульфат церия (IV), хлорид гексаамминкобальта (III), гексанитрокобальтат (III) натрия, при сополимеризации ВП и хитозана - сульфат церия (IV). Первые два соединения умеренно растворимы в воде, $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ растворяется в холодной воде, поэтому ограничений для их использования в синтезе не было. Синтез вели при температуре 60°C в случае ГЭМА и 60°C и 70°C в случае ВП. Использование гексанитрокобальтата (III) натрия преследовало 2 задачи. Наряду с тем, что Co (III) в комплексе $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ – выступает как компонент иницирующей системы, можно ожидать, что HNO_2 , образующаяся при распаде комплекса, будет выступать в качестве деструктора цепей хитозана и обеспечит получение модифицированного олигомерного водорастворимого продукта.

Привитую полимеризацию проводили при различных мольных соотношениях звеньев мономера и глюкозамина (моль/(осново-моль)). Мономер с

растворенным в нем инициатором вводили в реактор после установления постоянной температуры раствора хитозана. Концентрация иницирующих систем во всех реакционных смесях составляла 5×10^{-3} моль/л. Данная концентрация является оптимальной для получения целевого продукта привитого сополимера без разрушения цепей хитозана, так как ионы Ce^{4+} и Co^{3+} при больших концентрациях вызывают их неконтролируемую деструкцию. Синтез проводили в водноуксуснокислых растворах при различных значениях pH среды $\sim 4,8$ и $3,3$. При выборе значений pH преследовали цель исследовать влияние конформационных состояний макромолекул хитозана как на полимеризацию, так и на свойства продуктов (конформация макромолекул полисахарида соответственно - спираль и клубок).

Привитая полимеризация хитозана с ГЭМА

На рисунке 17 представлена зависимость изменения глубины превращения ГЭМА во времени при использовании различных иницирующих систем.

Из рисунка 17 видно, что во всех случаях предельная конверсия достигалась за время, не превышающее 2 часа, поэтому в последующих опытах продолжительность процесса ограничивали этим временем.

Глубина превращения мономера зависит как от соотношения компонентов, так и от природы иницирующей системы. Чем выше содержание мономера, тем выше конверсия, т.е. глубина превращения мономера прямо зависит от его концентрации. Рассмотрим результаты синтезов в растворах хитозана при pH среды = 4,8, когда его макромолекулы находятся в спиральной конформации. Наиболее полно протекает реакция в случае $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ при соотношении ГЭМА-хитозан $[\text{ГЭМА}]/[\text{глюкозамин}] = 4,8$ моль/(осново-моль), с глубиной превращения мономера $\sim 81\%$, тогда как при других соотношениях компонентов - менее 50% (рисунок 17, а). В случае иницирующей системы $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ (рисунок 17, б) максимальная глубина превращения ГЭМА составила всего лишь 50%, что свидетельствует о нецелесообразности использования данного инициатора для получения привитого сополимера ГЭМА с хитозаном.

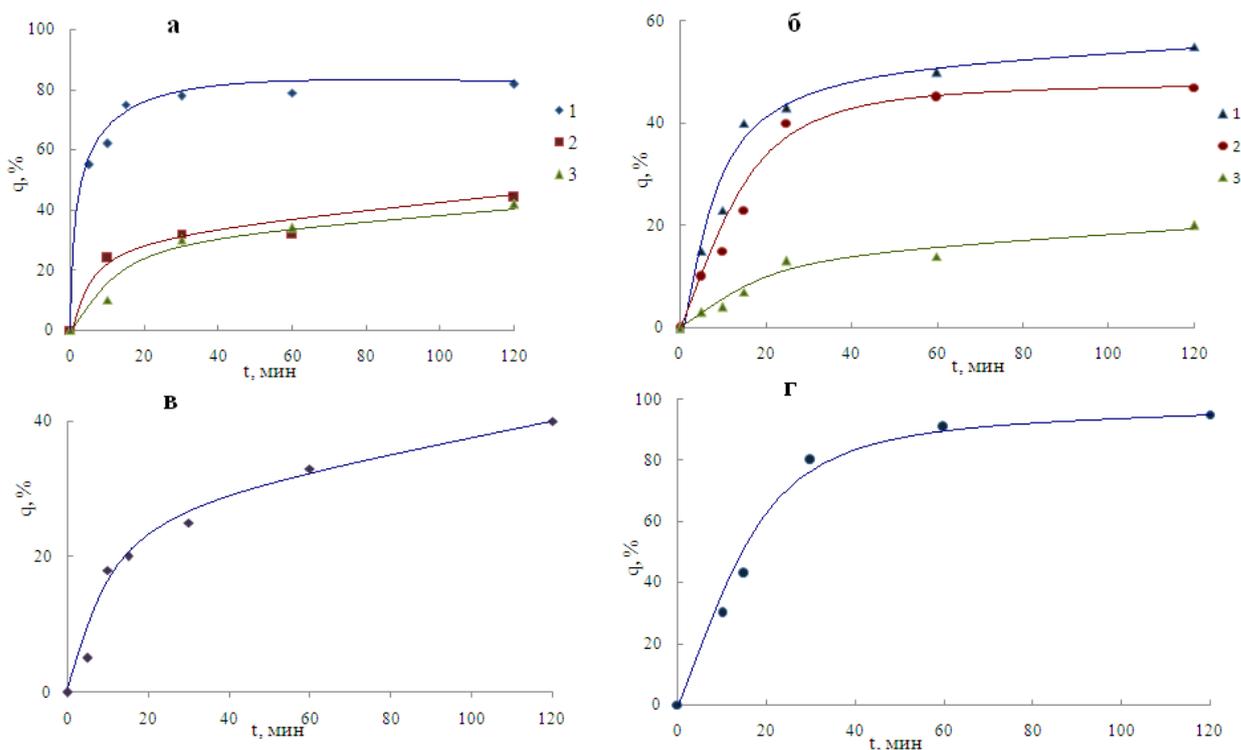


Рисунок 17. Изменение глубины превращения ГЭМА в процессе полимеризации на хитозан во времени с различными иницирующими системами. $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$.

а, б - $\text{pH} = 4,8$; $[\text{ГЭМА}]/[\text{ХТЗ}] = 1 - 4,8$; 2 - 2,4; 3 - 1,2 (моль/(осново-моль)).

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

в - $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$; $\text{pH} = 4,8$; $[\text{ГЭМА}]/[\text{ХТЗ}] = 4,8$ моль/(осново-моль).

г - $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; $\text{pH} = 3,3$; $[\text{ГЭМА}]/[\text{ХТЗ}] = 4,8$ моль/(осново-моль)

Влияние конформационного состояния макромолекул хитозана на характер процесса исследовали при соотношении реагентов $[\text{ГЭМА}]/[\text{глюкозамин}] = 4,8$ моль/(осново-моль) и значениях pH среды - 3,3 и 4,8, когда достигается максимальная глубина конверсии мономера. Если в случае спиральной конформации макромолекул хитозана глубина превращения ГЭМА достигает 81% (рисунок 17, а), то, в случае конформации клубок, она составляет ~ 94% (рисунок 17, г) при прочих равных условиях.

Существенно влияние конформационного состояния макромолекул хитозана не только на глубину превращения мономера, но и на фазовое состояние системы после завершения процесса синтеза. При спиральной конформации макромолекул полисахарида на протяжении всего синтеза и по его окончании

система представляла собой прозрачные гомогенные растворы. В конформации макромолекул клубок раствор сополимера полиГЭМА с хитозаном уже на начальных стадиях процесса (рисунок 18) и после его завершения представляет собой агрегативно устойчивый коллоидный раствор.

Мы полагаем, что такой результат может быть обусловлен следующими факторами: влиянием концентрации кислоты ($\text{pH}=3$), провоцирующей выделение сополимера (ухудшение его растворимости) или конформационным влиянием хитозана с последующим образованием сополимера с высокой ММ. Первое предположение не подтвердилось, поскольку в полученный в первом случае раствор добавляли уксусную кислоту в концентрации, соответствующей второму синтезу. Сополимер не высаживается при повышении концентрации уксусной кислоты в растворе.



Рисунок 18. Растворы сополимера хитозан-ГЭМА, $[\text{ГЭМА}]/[\text{глюкозамин}] = 4,8$ моль/(осново-моль), инициатор- $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. 1 – $\text{pH} = 4,8$; 2 - $\text{pH} = 3,3$

На начальных стадиях процесса внутри- и межмолекулярные взаимодействия за счет водородных связей по всей длине макромолекул хитозана в спиральной конформации ($\text{pH} = 4,8$) ограничивают доступность реакционных центров полисахарида, что в этом случае (гомогенные растворы) приводит, как будет доказано ниже, к образованию большого количества гомополимера. В противоположность этому, в случае pH среды $\sim 3,3$, внутри- и межмолекулярное взаимодействие макромолекул хитозана, имеющих конформацию клубка, существенно ниже. Это было доказано при расчете кажущихся энергий активации вязкого течения растворов хитозана, находящегося в различных

конформационных состояниях. Таким образом, в более кислых средах доступность реакционных центров полимера приводит к тому, что большая часть мономера идет на образование привитого сополимера с полисахаридом с большой ММ. По результатам ГПХ ММ привитого сополимера в коллоидном растворе составляет в зависимости от условий синтеза от $2,0-2,5 \times 10^5$ против $4,0-6,0 \times 10^5$ для синтеза со спиральной конформацией макромолекул хитозана (гомогенный раствор). На основании изложенного можно полагать, что различие в фазовом состоянии продуктов синтеза обусловлено ограниченной растворимостью и высокой молекулярной массой привитых цепей сополимера.

Рассмотрим особенности модификации хитозана привитой полимеризацией с ГЭМА с использованием иницирующей системы $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$ (рисунок 17, в). Для синтеза с иницирующей системой $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$ взяли наиболее эффективное соотношение ГЭМА-хитозан $[\text{ГЭМА}]/[\text{глюкозамин}] = 4,8$ моль/(осново-моль), когда, как и в случае с соединением Ce^{4+} , достигается максимальная глубина превращения мономера. Глубина превращения ГЭМА не превышает $\sim 40\%$, однако при этом в процессе реакции происходит резкое уменьшение вязкости среды, что может быть следствием разрушения цепей хитозана и образованием низкомолекулярного гибридного продукта. Известно, что хитозан деполимеризуется азотистой кислотой до олигомерных продуктов [146]. В процессе синтеза, по-видимому, из комплекса $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$ высвобождаются ионы NO_2^- , и образующаяся *in situ* азотистая кислота разрушает цепь хитозана с образованием водорастворимых олигомеров.

Для подтверждения этого вывода в тех же условиях были поставлены контрольные опыты в отсутствие мономера, и после завершения процесса определены ММ хитозана методом гель-проникающей хроматографии. Действительно, ММ хитозана резко снижается в 20 раз - с $2,3 \times 10^5$ до значения $1,1 \times 10^4$ уже в течение 1 часа (рисунок 19). Результаты воспроизводимы во многих повторностях и независимо от ММ хитозана получают водорастворимые олигомеры хитозана. Этот факт может иметь самостоятельное значение как

способ получения олигомеров хитозана *in situ* с использованием низких концентраций инициатора.

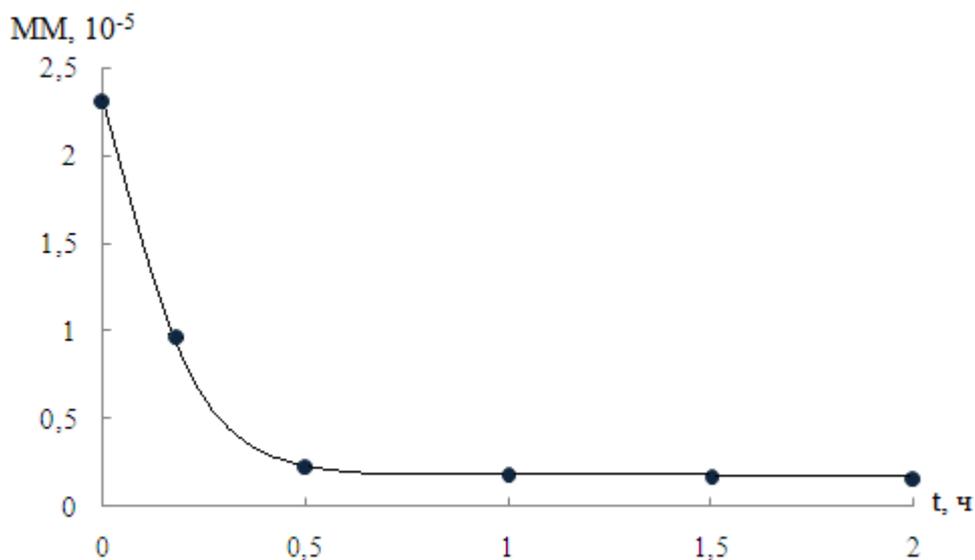


Рисунок 19. Зависимость ММ хитозана от времени в присутствии $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$, $\omega(\text{ХТЗ}) = 3$ мас. %, $[\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6] = 5 \times 10^{-3}$ моль/л, $T = 60^\circ\text{C}$

Снижение ММ хитозана подтверждает высказанное предположение, что в процессе синтеза распад инициатора $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$ приводит к образованию азотистой кислоты, вызывающей деструкцию цепей полисахарида. В то же время определение ММ продукта синтеза методом ГПХ, показало, что она составила $7,3 \times 10^4$, это в ~ 7 раз больше массы полученного олигомера хитозана. Это свидетельствует об образовании сополимера. Следует оговориться, что не исключено образование блоков ГЭМА на концах цепи полисахарида, и сополимеризация может идти по двум реакционным центрам хитозана: с участием функциональных групп глюкозамина и по концевым группам разрушаемой цепи полисахарида. В итоге возможно образование сильноразветвленного гибридного продукта. Высокий индекс полидисперсности (> 2) говорит в пользу этого предположения. Несмотря на то, что расходуется всего 40% мономера, этот синтез представляет интерес с точки зрения одностадийного метода получения модифицированного водорастворимого продукта олигомерного хитозана, перспективного для медицинских приложений, в частности, как будет показано далее – для создания кровоостанавливающих материалов при внутренних

кровотечениях и исключает образование нерезорбируемых гранулем, как в случае высокомолекулярных соединений.

Характеристикой привитой полимеризации являются степень и эффективность прививки, а также ММ привитых цепей. Эффективность прививки - это отношение массы привитого полимера к массе всего запolyмеризовавшегося мономера, степень прививки – это отношение массы привитого полимера к массе хитозана. Продукт полимеризации может представлять собой как сополимер, так и смесь сополимера и гомополимера ГЭМА. Для отделения возможно образовавшегося гомополимера из образцов продукта синтеза, пробу осаждали в большом объеме растворителя, являющегося осадителем гибридного продукта, а затем дополнительно проводили экстракцию гомополимера ГЭМА на аппарате Сокслета изопропиловым спиртом. Степень и эффективности привитой полимеризации хитозана с ГЭМА представлена в таблице 4.

Таблица 4. Степень и эффективность прививки при привитой полимеризации хитозана с ГЭМА, ω (ХТЗ) = 3 мас. %

| Иницирующая система | Конформация макромолекул | [ГЭМА]/[ХТЗ], моль/(основомоль) | q, % | СП, мас. % | ЭП, мас. % |
|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|------|------------|------------|
| $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ | Спираль (pH=4,8) | 4,8 | 80 | 300 | 91 |
| $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ | Клубок (pH=3,3) | 4,8 | 97 | 390 | 99 |
| $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$ | Спираль (pH=4,8) | 4,8 | 40 | 150 | 92 |
| $\text{Co}(\text{NH}_3)\text{Cl}_3$ | Спираль (pH=4,8) | 4,8 | 50 | 180 | 89 |

Степень прививки ГЭМА на хитозан с иницирующей системой $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (конформация макромолекул хитозана – спираль, pH=4,8) составила - 300%, и выход привитого ГЭМА ~ 93 % (таблица 4), на долю гомополимера приходится 7%. Полимеризация в этих же условиях, но со значением pH реакционной среды 3,3 (конформация макромолекул – клубок) протекает полнее – степень прививки составила 390%, эффективность прививки в этом синтезе составила 99%. Таким образом, для обоих конформационных состояний макромолекул хитозана при

использовании инициатора $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, полимеризация характеризуется достаточно высоким выходом целевого продукта. Для системы с инициатором $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$, степень прививки в два раза меньше $\sim 150\%$, тем не менее, выход привитого сополимера составил $\sim 94\%$. Это подтверждает вывод о том, что можно пожертвовать потерей ГЭМА, но получить целевой олигомерный продукт в соответствии с поставленной задачей. Если говорить о результатах синтеза с $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ и приблизительно половина мономера остается незаполимеризованной, хотя 90% запполимеризовавшегося мономера пошло на образование привитого сополимера.

Таким образом, при выборе иницирующей системы для привитой полимеризации ГЭМА на хитозан, лучше отдать предпочтение $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ввиду получения высокого выхода продукта и выбрать рН среды $=3,3$, при которой реакционные группы макромолекул хитозана находятся в конформации клубка.

Подтверждением образования привитого сополимера являются результаты ИК-спектроскопического исследования. В спектре исходного хитозана (рисунок 20, 1) наблюдаются полосы, соответствующие валентным колебаниям функциональных групп полимера – амидные на 1652 см^{-1} , 1563 см^{-1} . Кроме того, типичные полосы для сахаридов наблюдаются при 1153 см^{-1} , 1077 и 1034 см^{-1} (группа C-O-C). Полосы при 1379 см^{-1} , относятся к колебаниям ацетамидных групп. В продукте синтеза, отмытого от гомополимера, наблюдаются полосы поглощения, характерные как для ГЭМА, так и для хитозана. В спектре (рисунок 20, 2) появляется полоса при 1736 см^{-1} , соответствующая колебаниям $-\text{C}=\text{O}$ карбонильных групп ГЭМА.

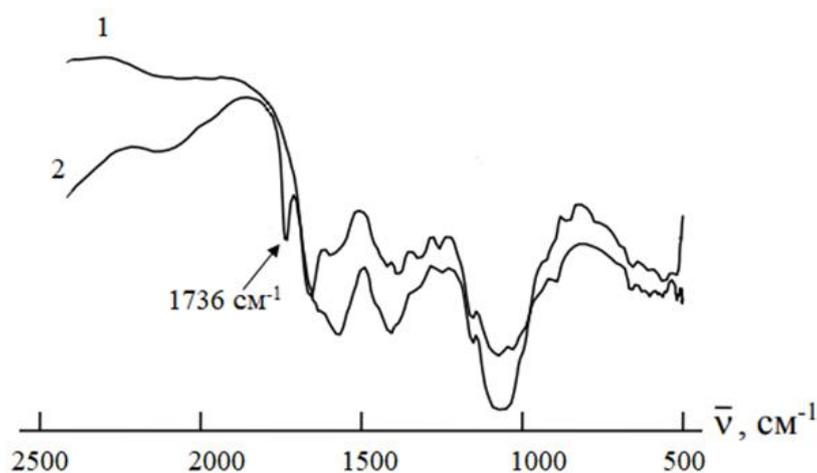


Рисунок 20. ИК – спектры хитозана (1) и сополимера хитозан-ГЭМА (2)

Привитая полимеризация хитозана с ВП и блок-сополимеризация ПВП с хитозаном.

Модификацию хитозана ВП для получения кровоостанавливающих и ранозаживляющих композиций широкого спектра назначения проводили двумя методами – привитой и блок-сополимеризацией. Выбор последнего метода обусловлен необходимостью минимизировать содержание синтетических звеньев полимера и размеры их блоков в составе биоматериалов, которые, в то же время, обеспечат водорастворимость продукта. Опыты были поставлены при различных соотношениях компонентов. В результате установлено, что для обеспечения водорастворимости сополимера достаточна концентрация компонентов, не превышающая значения $[\text{мономер}]/[\text{глюкозамин}] - 1,0 \text{ моль}/(\text{осново-моль})$. Полученные сополимеры в дальнейшем будут использоваться для внутренних применений.

Исследование кинетики привитой полимеризации ВП на хитозан проводили в двух температурных режимах – 60°C и 70°C , с иницирующей системой - сульфат церия (IV), и, как и в случае полимеризации с ГЭМА, при двух pH среды – 4,8 и 3,3 с различным мольным соотношением мономера к звеньям глюкозамина. Глубина превращения ВП в процессе полимеризации представлена на рисунке 21.

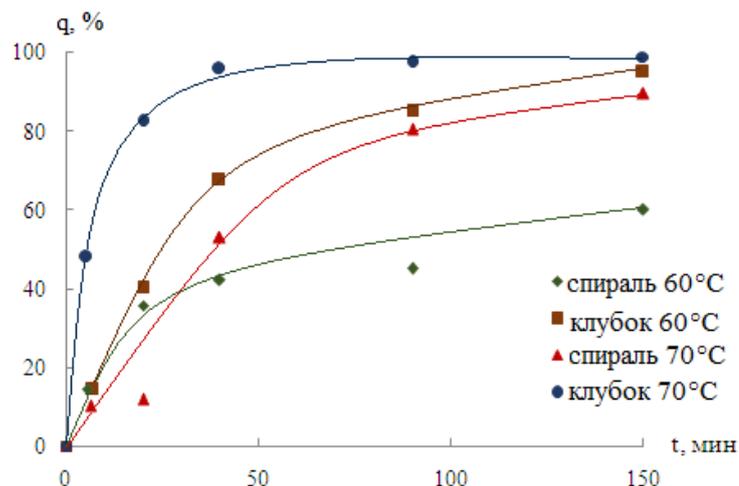


Рисунок 21. Глубина превращения ВП в процессе привитой полимеризации с хитозаном с инициатором $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. $[\text{ВП}]/[\text{ХТЗ}] = 1,0$ моль/(осново-моль)

Типичная схема зарождения активных центров радикальной природы на хитозане ионами церия приведена в литературном обзоре. Самостоятельно изучить процесс инициирования не удалось, поскольку спектры ЯМР не получилось идентифицировать.

Привитая полимеризация ВП с хитозаном, макромолекулы которого находятся в спиральной конформации, наиболее полно протекает при температуре 70 °С, процесс идет на 30% эффективнее ($q = 90\%$), чем при температуре 60 °С ($q = 60\%$). Процесс, когда макромолекулы хитозана находятся в конформации клубок, протекает с более высокой скоростью. Глубина превращения при 70 °С достигает 80% уже через 25 мин и при полном завершении процесса она достигает 98%.

Ситуация аналогична процессу с ГЭМА, и связана с тем, что, когда макромолекулы хитозана в конформации клубка, они образуют больше доступных реакционноспособных центров макромолекулы, в отличие от макромолекул хитозана в спиральной конформации ($\text{pH} = 4,8$), которые образуют сильные межмолекулярные взаимодействия за счет прочных водородных связей.

Кроме того, не исключена ассоциация макромолекул в процессе полимеризации. Наилучше показатели привитой полимеризации ВП с хитозаном достигаются, как и в случае с ГЭМА, при полимеризации, когда макромолекулы

хитозана находятся в конформации клубка: глубина превращения ВП достигает 98%, а ЭП = 94% (таблица 5).

Таблица 5. Степень и эффективность прививки при привитой полимеризации ВП на хитозан, $\omega(\text{ХТЗ}) = 3 \text{ мас. \%}$

| Иницирующая система, температура | Конформация макромолекул | [мономер]/ [глюкозамин], моль/(основомоль) | η , % | СП, мас. % | ЭП, мас. % |
|-------------------------------------|--------------------------|--|------------|------------|------------|
| $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 60 °С | Спираль (рН=4,8) | 1.0 | 53 | 20,5 | 58 |
| $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 60 °С | Клубок (рН=3,3) | 1,0 | 95 | 44 | 70 |
| $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 70 °С | Спираль (рН=4,8) | 1,0 | 85 | 45 | 80 |
| $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 70 °С | Клубок (рН=3,3) | 1,0 | 98 | 61 | 94 |

Одним из эффективных методов модификации хитозана, который полностью исключает образование гомополимера, является УЗ-метод синтеза блок-сополимеров. Блок-сополимеры хитозана с ПВП получали при ультразвуковой обработке раствора смеси гомополимеров в течение 30 мин при температуре 30-35°С. В работе использовали хитозан с ММ $2,3 \times 10^5$ г/моль и ПВП с ММ $1,8 \times 10^4$ г/моль. Во всех синтезах значение рН среды составляло 4,8, когда макромолекулы хитозана в процессе реакции находились в конформации спирали. Выбор именно такого значения рН среды обусловлен двумя причинами. Первая - структура макромолекул хитозана в спиральной конформации более жесткая, следовательно деструкция его цепей проходит эффективнее. Вторая - полученные блок-сополимеры планировали сразу использовать для формирования ранозаживляющих пленок, поэтому было необходимо выбрать значение рН среды близкое к нейтральному.

При всех достоинствах УЗ-метода синтеза блок-сополимеров при получении их на основе синтетических полимеров встает проблема расшифровки структуры цепей блок-сополимера. В данном случае проблема снимается, так как возможно провести деструкцию блоков хитозана до водорастворимых монопродуктов под действием ферментов и выделить блоки ПВП. Ферментативное разложение цепей хитозана проводили амилазой и папаином. Методом ГПХ был выполнен анализ ММ исходных гомополимеров (до ультразвуковой обработки), блок-сополимеров, являющихся водорастворимыми (после ультразвуковой обработки), блоков ПВП после деструкции хитозана и молекулярно-массового распределения (рисунок 22, а, б, таблица 6).

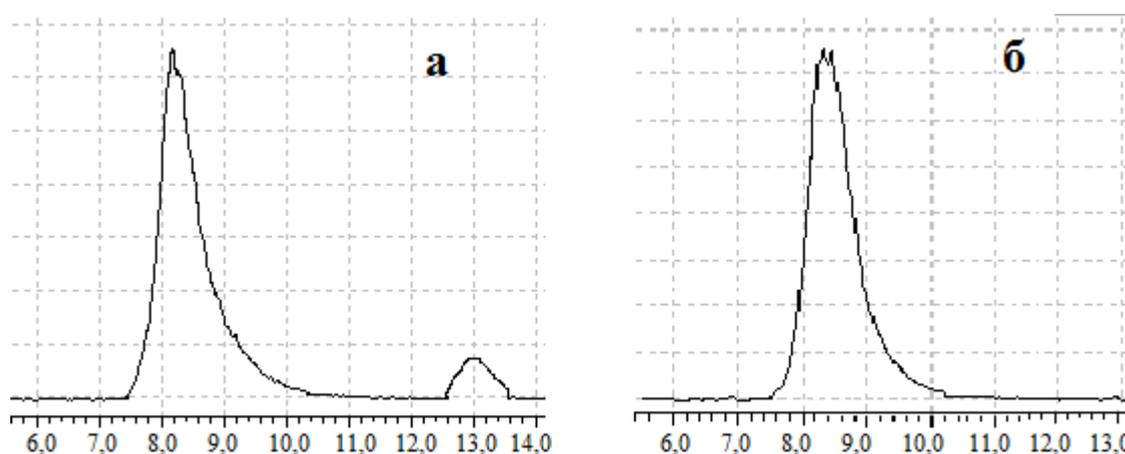


Рисунок 22. Хроматограммы а) - смеси гомополимеров до ультразвуковой обработки. $[\text{мономер}]/[\text{глюкозамин}] = 1,0 \text{ моль}/(\text{осново-моль})$, б) - блок-сополимера хитозана с ПВП

Таблица 6. Результаты ГПХ-анализа смеси гомополимеров до ультразвуковой обработки (пики 1,2), и после (пик 3). $[\text{мономер}]/[\text{глюкозамин}] = 1,0 \text{ моль}/(\text{осново-моль})$

| Пик | Полимер | $M_n \times 10^{-5}$ | $M_w \times 10^{-5}$ | M_w/M_n |
|-------------------|-----------|----------------------|----------------------|-----------|
| Рис. 2 (а). Пик 1 | ХТЗ | 1,79 | 2,36 | 1,32 |
| Рис. 2 (а). Пик 2 | ПВП | 0,15 | 0,18 | 1,20 |
| Рис. 2 (б). Пик 1 | Сополимер | 1,84 | 2,22 | 1,21 |

Из полученных данных видно, что до ультразвуковой обработки (рисунок 22,а) смесевая композиция имеет 2 моды: одна из которых характеризует хитозан, другая – ПВП (таблица 6). Следует оговориться, что предварительно было определено время выхода хитозана и ПВП в их соответствующих растворах. Время выхода в смеси компонентов соответствует времени выхода каждого из гомополимеров. На хроматограмме блок-сополимера (рисунок 22, б) наблюдается одна мода при полидисперсности по ММ 1,21, что свидетельствует об отсутствии гомополимера и образовании монопродукта с ММ равной $2,22 \times 10^5$ г/моль.

Блок-сополимер хитозан-ПВП дважды осаждали раствором ацетона и сушили в вакуумном шкафу до постоянной массы. Навеску блок-сополимера растворяли в воде и проводили в нем ферментативное разложение папаином блоков хитозана. Методом ГПХ определили ММ оставшихся в растворе блоков ПВП. Она составила $6,2 \times 10^3$. Ниже дается расчет структуры одного из блок-сополимеров.

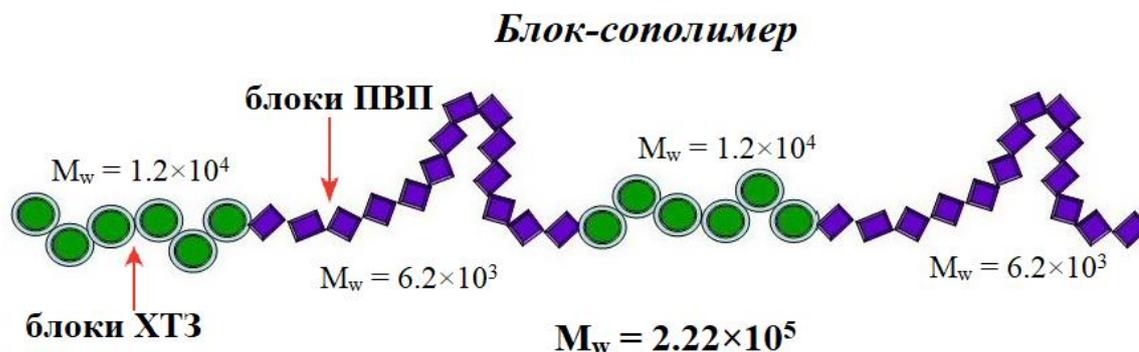
На основании данных по ММ сополимеров, блоков ПВП и составу соответствующего сополимера можно рассчитать строение макромолекул блок-сополимеров.

ММ блок-сополимера в образце с соотношением компонентов [мономер]/[глюкозамин] = 0,5 моль/(осново-моль) равна $2,2 \times 10^5$ г/моль. Содержание ПВП в цепи – 33 мол. %. Суммарная масса всех блоков ПВП в макромолекуле составляет $\sim 7,4 \times 10^4$ ($2,2 \times 10^5 \times 0,33$), ММ ПВП в одном блоке $6,2 \times 10^3$ г/моль, следовательно, число блоков ПВП в макромолекуле составляет 12. Соответственно число блоков хитозана тоже равно **12**.

Количество звеньев ВП в блоке равно **60** ($6,2 \times 10^3 / 111$ (ММ ВП)).

Количество блоков ПВП равно количеству блоков хитозана с точностью до 1 блока, то есть **12**. Содержание хитозана в цепи составляет 66,7 мол. % (100%-33,3%). Суммарная масса всех блоков хитозана в макромолекуле составляет $\sim 1,48 \times 10^5$ ($2,2 \times 10^5 \times 0,67$). ММ блока хитозана равна $1,2 \times 10^4$ ($1,48 \times 10^5 / 12$), следовательно, количество звеньев в блоке составляет **74** ($1,2 \times 10^4 / 168$ г/моль, где 168 – усредненная ММ одного звена хитозана).

На основании расчетов выявлено, что число блоков ПВП в макромолекуле составляет **12** с ММ одного блока $6,2 \times 10^3$ и количеством звеньев в блоке **60**. Соответственно число блоков хитозана тоже равно **12** с ММ блока $1,2 \times 10^4$ и количеством звеньев **74**.



Таким образом получены привитые и блок-сополимеры хитозана и ПВП, растворимые в широком диапазоне рН – в кислых и нейтральных средах. Привитые сополимеры в силу высоких значений ММ привитых цепей могут быть использованы для материалов при наружном применении в то время как блок-сополимеры подобной структуры – для внутреннего. Олигомерная структура блоков хитозана и ВП обеспечит пролонгированное ферментативное расщепление цепей в организме, не приводящее к образованию гранулём. Молекулярная масса звена ПВП в сополимере позволит ему быстро выводиться из организма и не вызовет отрицательной иммунной реакции.

3.2.2. Свойства пленок образцов полученных сополимеров

Сополимеры хитозана, модифицированные привитой и блок-сополимеризацией, могут быть использованы как компоненты при создании ранозаживляющих материалов в различных формах: в виде пленочных и волокнистых изделий, гелей, губок, мембран. В связи с этим, необходимо знать их структуру и физико-механические - прочностные и деформационные - свойства

Физико-механические свойства пленок сополимеров.

Исследования были проведены на пленочных образцах. Пленки сополимеров получали формованием их на лавсановую подложку из растворов привитых и блок-сополимеров.

Физико-механические свойства привитых сополимеров хитозан-ГЭМА приведены в таблице 7.

Таблица 7. Физико-механические свойства хитозана и привитых сополимеров хитозан-ГЭМА

| № | Иницирующая система | рН реакционной среды | Степень полимеризации | σ , МПа | ϵ , % |
|---|---------------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| 1 | - | 4,8 | 0 | 25,0 -27,0 | 1,9 |
| 2 | $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ | 4,8 | 180 | 29,0 | 3,7 |
| 5 | $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ | 4,8 | 300 | 32,5 | 3,5 |
| 6 | $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ | 3,3 | 390 | 35,0 | 4,2 |

Хитозан при прочности на разрыв 27 МПа практически не проявляет деформационных свойств. Пленки сополимера хитозан-ГЭМА с инициатором – Co^{3+} обладают физико-механическими свойствами на уровне хитозана, что может быть обусловлено тем, что доля привитого ГЭМА незначительна. Пленки, полученные из олигомерного продукта, оказались очень хрупкими, их физико-механические свойства не удалось охарактеризовать. Пленки сополимера хитозан-полиГЭМА, полученные с иницирующей системой $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ в реакционных средах с различными значениями рН (т.е. с конформацией макромолекул хитозана как клубок, так и спираль) обладают повышенными физико-механическими характеристиками по сравнению с исходным полисахаридом – они более прочные (до 33-35 МПа) при деформации – 3,5-4%. Более высокими физико-механическими свойствами обладают пленки, полученные из растворов хитозана с конформацией макромолекул – клубок с более высокой степенью полимеризации.

Существенно более высокими физико-механическими характеристиками обладают пленки, полученные на основе сополимеров хитозан-ПВП (таблица 8).

Установлено, что прочность при разрыве и относительное удлинение зависят от состава блок-сополимеров и конформации макромолекул хитозана в случае привитых сополимеров.

Таблица 8. Результаты физико-механических испытаний блок- и привитых сополимеров хитозан-ПВП

| | № | [ПВП]/[глюкозамин], моль/(осново-моль) | pH раствора (кислота) | σ , МПа | ε , % |
|-----------------------|----|---|--------------------------|----------------|-------------------|
| Блок- сополимер | 1 | 0,25 | 4,8 (УК) | 46,8 | 3,6 |
| | 2 | 0,50 | 4,8 (УК) | 52,9 | 2,6 |
| | 3 | 1,00 | 4,8 (УК) | 54,2 | 2,1 |
| | 4 | 0,25 | 4,8 (HCl) | 49,3 | 2,3 |
| | 5 | 0,50 | 4,8 (HCl) | 55,7 | 2,2 |
| | 6 | 0,25 + 0,5 мас. % глицерин | 4,8 (HCl) | 40,8 | 17,6 |
| | 7 | 0,25 + 0,7 мас. % глицерин | 4,8 (HCl) | 36,4 | 25,7 |
| | 8 | 0,25 + 1 мас. % глицерин | 4,8 (HCl) | 30,3 | 33,9 |
| Привитой сополимер | 9 | 1,00 | 4,8 | 53,4 | 2,6 |
| | 10 | 1,00 | 3,3 | 60,0 | 4 |

Более высокими по сравнению с хитозаном прочностными свойствами характеризуются пленки блок-сополимеров с большим содержанием звеньев ВП. Значение их разрушающего напряжения достигает 54-56 МПа при сравнительно невысокой деформации, которая составляет 2,3%. Однако оптимальными с точки зрения практического использования являются пленки с отношением [ПВП]/[глюкозамин] 0,25 моль/(осново-моль) – они более эластичны и содержат наименьшее количество ВП.

Близкими к блок-сополимерам физико-механическими свойствами обладают привитые сополимеры хитозан-ВП – значение разрушающего напряжения достигает показателя 60 МПа при деформации 4%.

Для повышения эластичности пленок был использован глицерин, как пластификатор, в интервале концентраций – 0,5; 0,7 и 1 мас. % (таблица 8). После введения в раствор сополимера глицерина, наблюдаем закономерное увеличение относительного удлинения пленок до 35%, но уменьшение прочности до 30,3 МПа. Известно, что прочность полимерных материалов уменьшается с

увеличением пластичности [147]. Для практических целей достаточно введение 0,5 мас. % глицерина в состав блок-сополимера, когда прочность достигает 41%, а деформация 17%. Такие высокие показатели деформации позволят использовать данные пленки в составе ранозаживляющих и кровоостанавливающих перевязочных материалов в медицине и ветеринарии.

Была доказана газопроницаемость полученных пленок сополимеров на примере прохождения газовой смеси многокомпонентной стандартизированной газовой смеси (CO , CO_2 , CH_4 , C_2H_2 , C_2H_4) через мембрану из пленки состава № 6 (таблица 8). Была сконструирована приставка к газовому хроматографу, в которую зажимали мембрану и пропускали через нее газовую смесь из баллона. Газопроницаемость достигала 90-98%, следовательно, полученные пленки сополимеров являются "дышащими", газопроницаемыми для воздуха, а значит могут использоваться для закрытия травмированных участков кожи.

В целом, можно сделать вывод, что пленки сополимеров, полученные из растворов с исходной конформацией макромолекул хитозана - клубок, более прочные и эластичные, по сравнению со спиральной конформацией и обладают более упорядоченной структурой, независимо от природы прививаемого мономера. Различие физико-механических свойств сополимеров может быть обусловлено различием их структуры, которая была изучена методами рентгенофазового анализа и исследованием топографии поверхности пленок методом АСМ.

Методом рентгеновской дифрактометрии сравнили структуру пленок хитозана с конформацией макромолекул – клубок и сополимера хитозан-поли-ГЭМА, полученного из соответствующих растворов полисахарида. Из рис. видно, что пленка хитозана обладает кристаллическостью (рисунок 23, 1). Сополимеризация хитозана с ГЭМА приводит к почти полной аморфизации структуры пленки, что объясняет повышение физико-механических характеристик сополимеров по сравнению с исходным хитозаном (рисунок 23, 2).

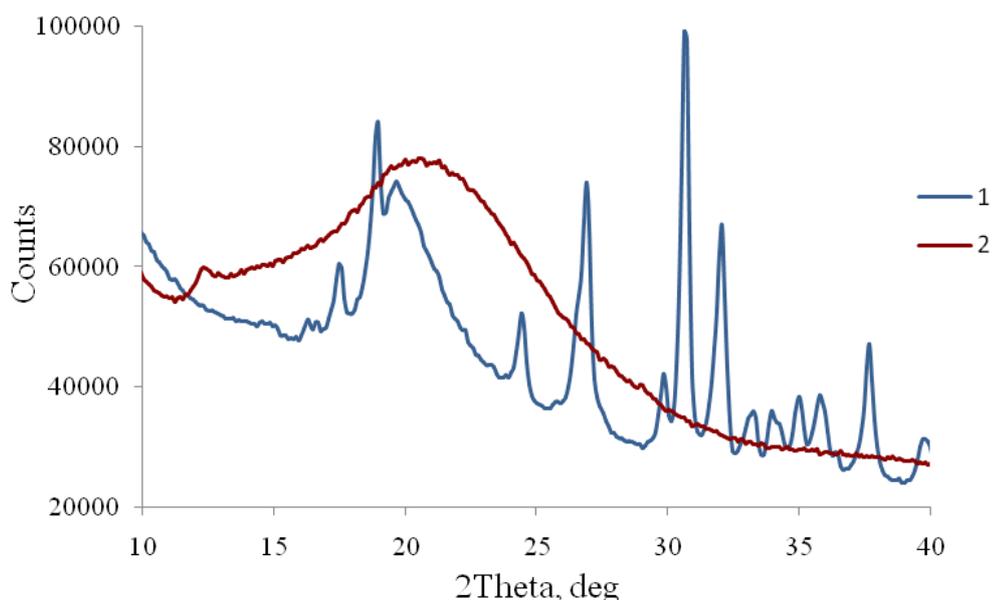


Рисунок 23. Дифрактограммы образцов хитозана с конформацией макромолекул - клубок (1) и его сополимера хитозан-поли-ГЭМА (2)

Изучили топографию поверхности пленок сополимеров методом АСМ (рисунок 24). Сравним первые два образца, отличающиеся исходным конформационным состоянием хитозана.

Поверхность пленки сополимера хитозан-прив-ГЭМА, полученного, когда макромолекулы хитозана находились в спиральной конформации, отличается выраженной изолированной зернистой структурой (агломератами), тогда как в конформации макромолекул хитозана - клубок видно, что структура пленки сополимера более выровнена и собрана в ячеистые образования с перепадом по высоте до 2 мкм. Структура образца привитого низкомолекулярного полимера хитозан-прив-ГЭМА, полученного с иницирующей системой $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$ (рисунок 24, в) при рН среды = 4,8 представляет собой однородную ячеистую поверхность с перепадом по высоте от 1 до 1,5 мкм.

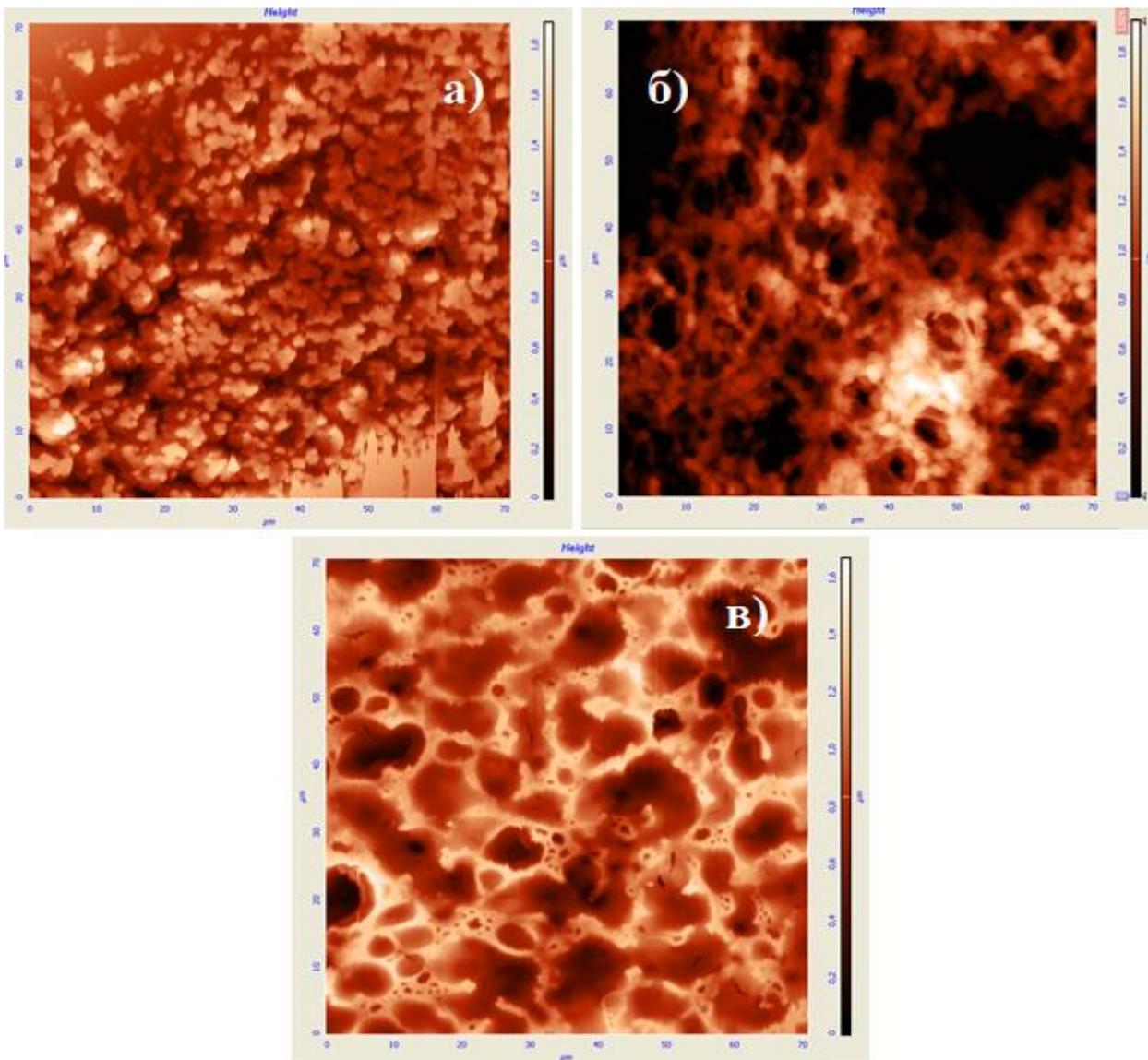


Рисунок 24. Топография поверхности пленок привитых сополимеров хитозан-ГЭМА с различными иницирующими системами и значениями pH среды:

- а)** $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, pH = 4,8, СП=300%;
- б)** $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, pH = 3,3, СП=390%;
- в)** $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$, pH = 4,8, СП=153%

На рисунке 25 приведена топография поверхности пленок ПВП, хитозана, смеси их гомополимеров и блок-сополимера.

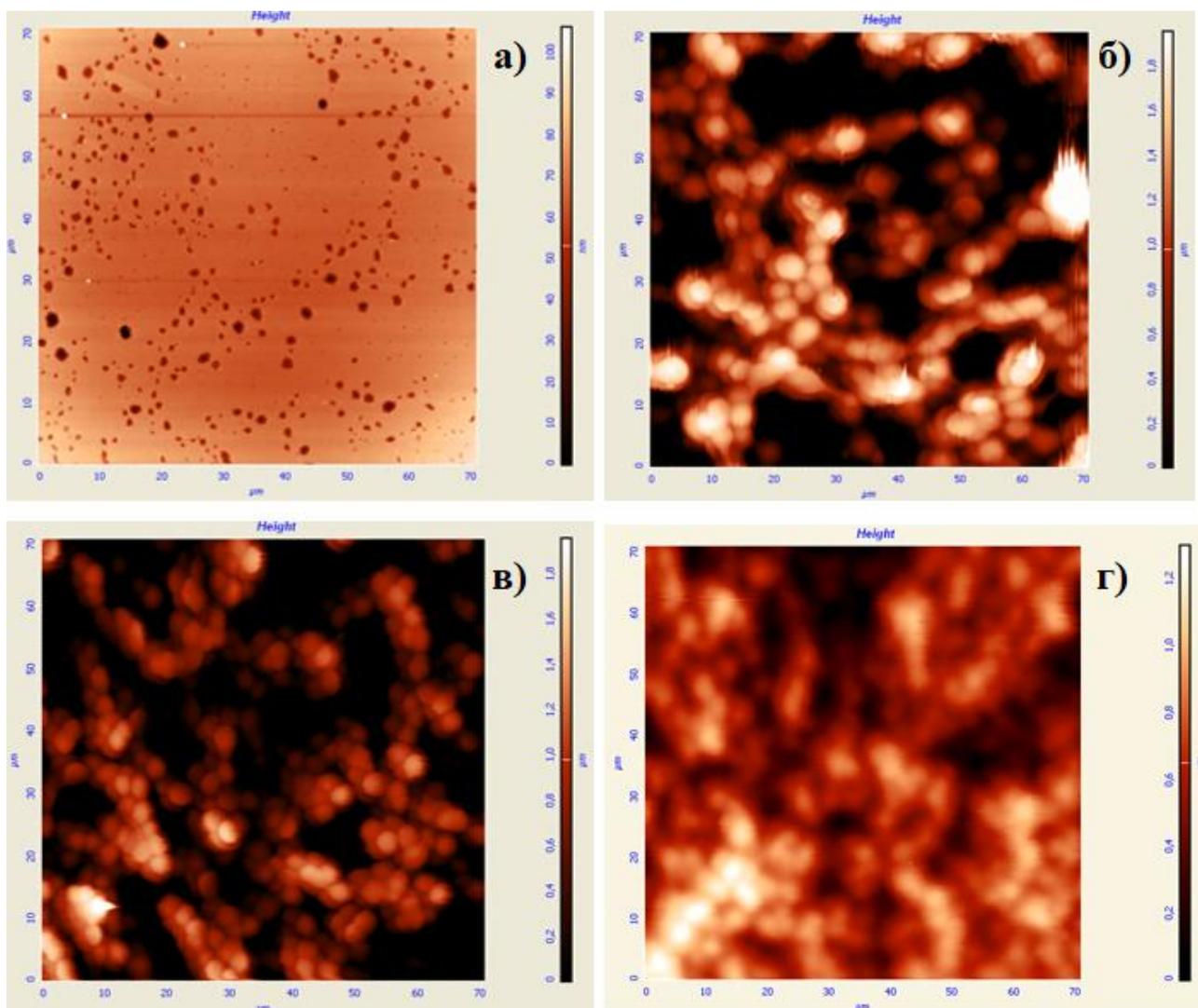


Рисунок 25. Топография поверхности пленок: **а)** исходного ПВП; **б)** исходного хитозана; **в)** смесь гомополимеров – хитозана и ПВП (1:1); **г)** блок-сополимер хитозан-ПВП (1:1)

Видно, что структура пленки блок-сополимера (рисунок 25, г) по сравнению с исходными полимерами и их смесью (рисунок 25, а-в) более выровнена, перепады по высоте уменьшаются с 1,8 мкм до 1,2 мкм.

Подводя итог по синтезу и свойствам полученных сополимеров хитозана с ГЭМА и ВП, более перспективно использование в составе кровоостанавливающих и ранозаживляющих материалов именно ВП, поскольку глубина превращения мономера и физико-механические свойства его сополимеров с хитозаном гораздо выше, чем сополимеров хитозан-ГЭМА.

К тому же ПВП открывает более широкий спектр применения не только для наружного, но и для внутреннего применения, как это обсуждалось выше.

3.3. Кровоостанавливающая композиция на основе хитозана, комплексно связанного с ионами кальция

Разработка биосовместимой кровоостанавливающей полимерной композиции на основе хитозана базировалась на анализе литературных данных о процессе остановки кровотоков при нарушении целостности сосудистых стенок кровеносной системы в организме. Остановка кровотечения (гемостаз) происходит по двум механизмам.

В мелких сосудах - путем сосудистого-тромбоцитарного (клеточного) гемостаза. В основе этого процесса лежит образование тромбоцитарной пробки за счет адгезии (прикрепления к поврежденной поверхности) и агрегации (склеивания между собой) тромбоцитов и окклюзия кровеносного сосуда.

В более крупных сосудах происходит коагуляционный (плазменный) гемостаз с участием плазменных факторов свертывания крови. Он представляет собой каскад матричных ферментативных реакций, в котором проферменты (предшественники - неактивные факторы свертывания крови), переходя в активное состояние, способны последовательно активировать другие факторы свертывания крови (рисунок 26). [148,149].

Конечной целью этого каскада реакция служит превращение растворимого белка плазмы фибриногена (I фактор свертывания) в нерастворимый белок – фибрин с последующим образованием фибринового сгустка и окклюзией кровеносного сосуда. К факторам свертывания, обеспечивающим процесс гемостаза, относятся и ионы кальция (IV фактор свертывания) и протромбин (II фактор свертывания). Протромбин - белок плазмы - вырабатывается в печени, причем для его образования необходим витамин К. Процесс коагуляции не может инициироваться без еще одного компонента – тромбопластина (III фактор свертывания) – белково-фосфолипидного фрагмента мембран клеток сосудистой стенки, высвобождающегося в процессе их разрушения при травмах. В присутствии ионов кальция, тромбопластина и протромбиназы (матрично-ферментативный комплекс) - протромбин преобразуется в активный тромбин – протеолитический фермент, который превращает растворимый белок фибриноген

в нерастворимый фибрин. Так образуется сгусток, который при разрастании превращается в тромб.

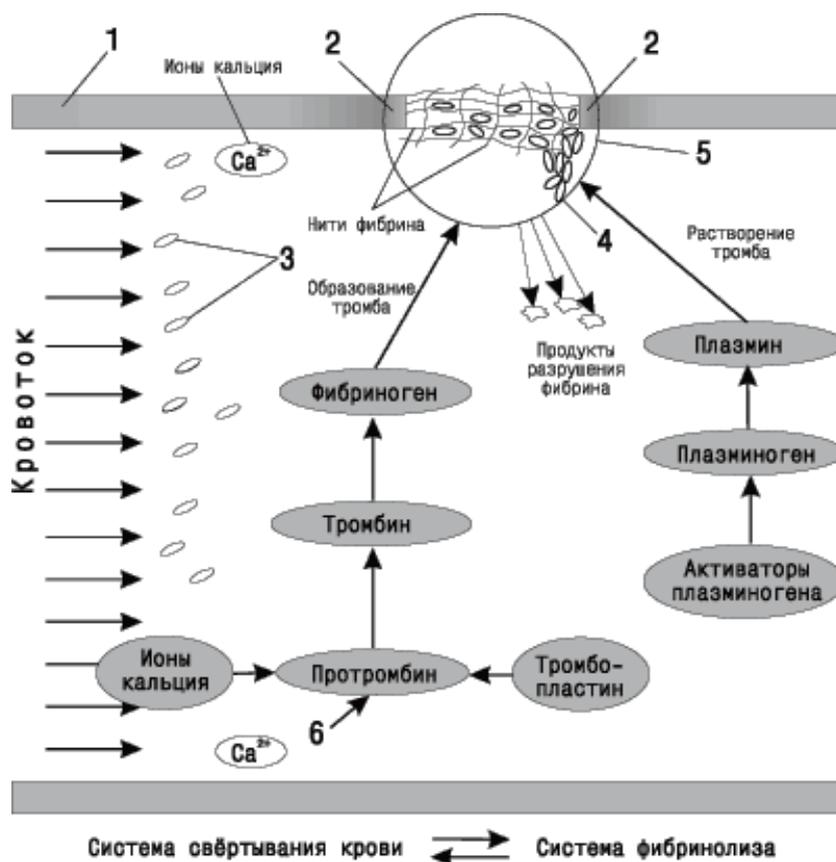


Рисунок 26. Динамическое равновесие систем свертывания крови и фибринолиза: 1 - стенка кровеносного сосуда; 2 - повреждение стенки сосуда; 3 - тромбоциты; 4 - адгезия и агрегация тромбоцитов; 5 – фибриновый сгусток (тромб); 6 - факторы свертывания

На рисунке 26 указаны только базовые участники сложнейшего процесса гемостаза. Только плазменных (присутствующих в плазме) факторов свертывающей системы насчитывается около 15, а ведь есть еще и клеточные (тромбоцитарные, эритроцитарные, лейкоцитарные, эндотелиальные).

Следует отметить, что матричный каскад реакций, приводящий к тромбообразованию, происходит только в присутствии ионов кальция. Ионы кальция связывают факторы свертывания с фосфолипидными фрагментами цитоплазматических мембран клеток крови, обеспечивают белковым молекулам формирование нативной конформации, в результате чего открываются их

активные центры. Это позволяет белкам принимать участие в ферментативных реакциях гемостаза.

Таким образом, следует выделить два момента, важных при разработке кровоостанавливающей композиции. Во-первых, необходима матрица, на которой будут фиксироваться ферменты (факторы свертывания крови). Во-вторых, - присутствие ионов кальция, обеспечивающих связь факторов свертывания с фосфолипидной матрицей и дальнейшее осуществление последовательного ряда мембранозависимых ферментативных реакций, с образованием в итоге конечного продукта - нерастворимого белка фибрина.

Функцию искусственной матрицы, являющейся аналогом клеточных мембран, не травмирующей и полностью покрывающей раневую поверхность, способен выполнять хитозан. Кроме того, следует отметить, что хитозан, обладая высокими хелатообразующими свойствами, может связывать почти все ионы, кроме цезия и натрия. Таким образом, можно заранее создать матрицу, комплексно связанную с ионами кальция, способную связывать факторы свертывания крови.

3.3.1. Изучение образования комплексов хитозан-альбумин, хитозан- Ca^{2+}

Образование полимерного комплекса хитозан-белок.

Обоснованием использования хитозана как возможной матрицы – аналога клеточных мембран - в процессе свертывания крови, служит анализ работ [150, 151], в которых доказано образование полимерного комплекса между белками и полисахаридом, обусловленное электростатическими, Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями и водородными связями. Факторы свертывания крови - это растворимые белки плазмы. Поэтому можно полагать, что эти взаимодействия будут осуществляться и между хитозаном и белковыми компонентами крови. Одним из основных белков плазмы крови является альбумин. Поэтому было выполнено исследование по взаимодействию альбумина с хитозаном.

К раствору 3 мас. % солянокислого хитозана приливали водный раствор белка с концентрацией = 1,6 г/л. Концентрацию белка в растворе определяли в соответствии с общепринятой методикой спектрофотометрическим методом. По формуле Калькара рассчитывали содержание белка (мг/мл). В этом случае оптическую плотность одного и того же раствора измеряли при двух длинах волн - 260 и 280 нм.

$$C(\text{г/л}) = 1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}.$$

Снимали спектры раствора хитозана с альбумином во времени. Наблюдали очень быстрое уменьшение концентрации белка в растворе. Через 3 мин свободный альбумин в растворе не обнаруживается. На спектрах (рисунок 27) наблюдается уменьшение полосы поглощения в области 200-280 нм, соответствующей альбумину.

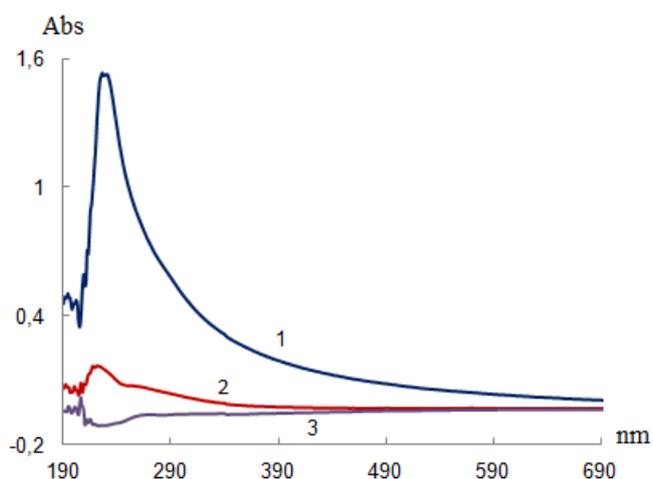


Рисунок 27. Спектры поглощения раствора хитозана, содержащего белок:

1 – 0,5 мин, **2** – 1,5 мин, **3** – 3 мин. T = 25 °C

Установлено, что через 0,5 мин концентрация свободного альбумина в растворе составляет 0.76 г/л, что в 2 раза меньше исходной, а уже к 3 мин он в растворе не обнаруживается. Таким образом, хитозан способен выполнять функцию матрицы – своеобразного аналога липидного бислоя мембраны клеток крови (факторов свертывания). Образование полимерных комплексов белков – факторов свертывания – с хитозаном позволит уменьшить время гемостаза за счет увеличения площади матричной активной поверхности, необходимой для протекания реакций гемостаза.

Исследование взаимодействия хитозана с ионами кальция.

Благодаря высоким хелатообразующим свойствам хитозана, он способен образовывать комплексы с ионами кальция, являющимися активными участниками процесса тромбообразования в организме. Образование такого комплекса подтверждается методами ИК-спектроскопии и DLS.

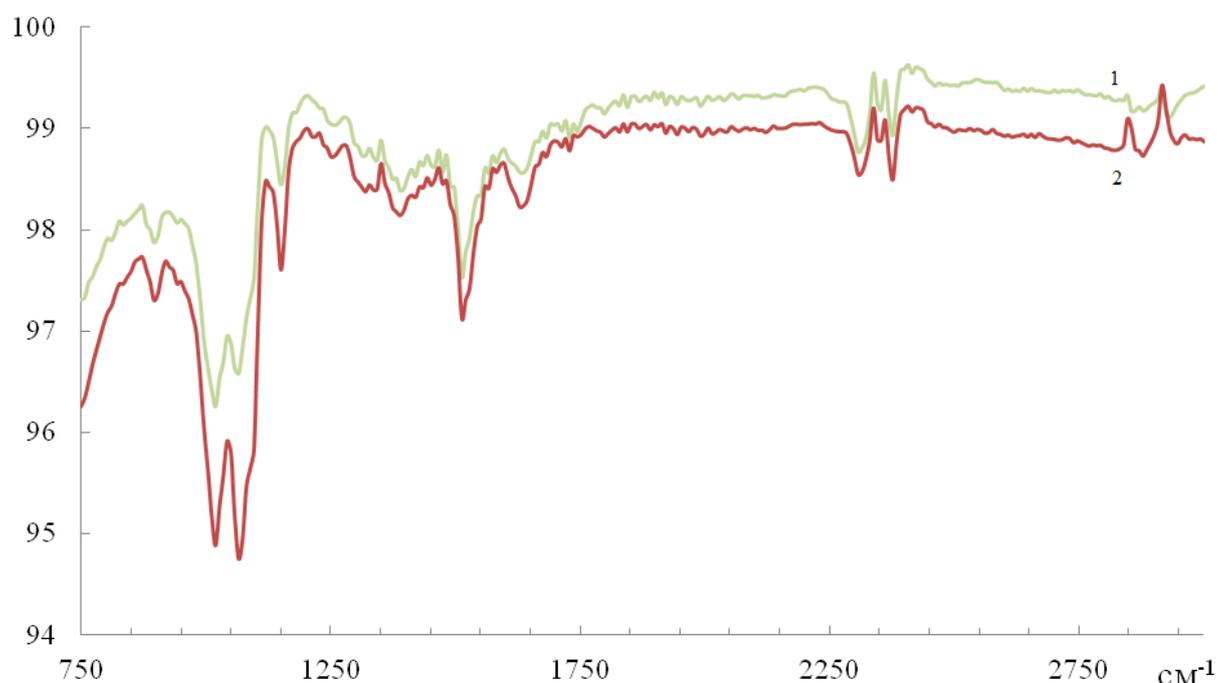


Рисунок 28. ИК-спектры хитозана (1) и хитозана, комплексно связанного с ионами кальция (2)

На рисунке 28 представлены типичные спектры хитозана и хитозана, комплексно связанного с ионами кальция. Происходило смещение полос хитозана с 1165 до 1149 см^{-1} , соответствующее валентным колебаниям групп С-О-С. Полосы в области 1504 см^{-1} и 1635 см^{-1} , соответствующие деформационным колебаниям аминогрупп хитозана, смещаются в область меньших длин волн на 8 см^{-1} соответственно. В области спектра 2290-2370 см^{-1} максимумы трех пиков хитозана с частотами: 2299, 2337 и 2368 см^{-1} , принадлежащих валентным колебаниям гидроксильных групп макромолекул хитозана, сдвигаются в область больших длин волн на 8-16 см^{-1} . Вследствие этого можно предположить, что главными активными центрами комплексообразования с ионами кальция в хитозане являются аминогруппы полисахарида.

Были определены средние размеры макромолекул хитозана методом DLS. Наблюдается уменьшение среднего эффективного диаметра макромолекул хитозана, комплексно связанного с ионами кальция (таблица 9).

Таблица 9. Эффективный диаметр макромолекул хитозана в растворе HCl и хитозана, комплексно связанного с ионами кальция

| Образец | Солевая форма хитозана | + 20 ммоль/л Ca ²⁺ | + 100 ммоль/л Ca ²⁺ |
|-------------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Эффективный диаметр, нм | 162 | 108,46 | 104,86 |

Средний эффективный диаметр макромолекул хитозана после комплексообразования сжимается ~ на 30 % против исходного состояния, независимо от концентрации ионов кальция в композиции.

Таким образом, в кровоостанавливающей композиции, представляющей собой готовую кальцийсодержащую матрицу, возрастает количество активных центров связывания факторов свертывания крови, существенно уменьшая время остановки кровотоков

3.3.2. Исследование влияния композиций на основе хитозана, содержащих ионы кальция, на временные показатели свертывания крови в опытах in vitro и in vivo

Изучение кровоостанавливающих свойств хитозана, приготовленного в водных растворах кислот, комплексно связанного с ионами кальция, проводили в опытах in vitro и in vivo с использованием экспериментальных животных (белых крыс). Все работы, связанные с изучением кровоостанавливающих свойств композиций, выполнялись под руководством д.б.н., профессора А.С. Корягина на кафедре биохимии и биотехнологии института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского.

Исследование эффективности кровоостанавливающей композиции в опытах in vitro.

В опытах in vitro исследовано влияние состава кровоостанавливающей композиции на временные показатели свертывания крови. Проведено две серии экспериментов. В первой серии изучено влияние концентрации ионов кальция в композиции на общее время свертывания крови, во второй - влияние на него природы растворителей хитозана (водных растворов различных кислот). Опыты выполнены на беспородных белых крысах. Кровь для анализа забирали из подязычной вены предварительно наркотизированных животных. Время свертываемости крови определяли с использованием гемокоагулографа N-331.

В 1 серии опытов готовили растворы с постоянной концентрацией хитозана - 3 мас. % в водных растворах янтарной кислоты. Содержание хлорида кальция варьировали от 0,5 ммоль/л до 100 ммоль/л. Цельную кровь помещали в кювету, приливали 100 мкл исследуемой композиции и снимали показания прибора. В начале было исследовано влияние концентрации ионов кальция в составе базовой композиции водного раствора сукцината хитозана на общее время свертываемости цельной крови (таблица 10, рисунок 29).

Таблица 10. Общее* время свертываемости крови при различных концентрациях ионов кальция в опытах in vitro

| [Ca ²⁺], ммоль/л | 0 | 0,5 | 2 | 5 | 10 | 20 | 100 |
|------------------------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|
| t, с | 156±5 | 137±8 | 100±5 | 60±3 | 40±2 | 45±2 | 43±3 |

* - общее время свертывания – это время окончания свертывания крови и образования тромба.

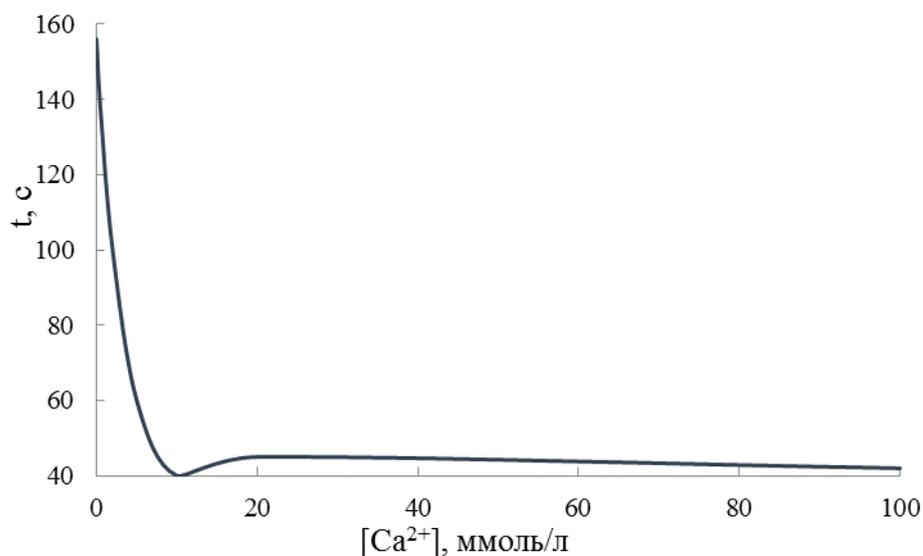


Рисунок 29. Зависимость времени свертывания крови от концентрации ионов кальция в композиции

Как видно из данных, представленных в таблице 10 и на рисунке 29, при достижении значений концентрации ионов кальция в композиции ~10-20 ммоль/л, время свертывания крови понижается почти в 4 раза относительно контроля (156 с) и при дальнейшем увеличении концентрации остается практически неизменным. Таким образом, установлена оптимальная концентрация ионов кальция в композиции, составляющая 10-20 ммоль/л, обеспечивает эффективное время свертывания крови *in vitro* – 40 с.

Таблица 11. Начало и общее время свертываемости крови в опытах *in vitro* в зависимости от природы растворителя

| Состав композиции | Начало свертываемости, с | Общее время свертываемости, 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 |

Во 2 серии опытов изучали влияние природы растворителя - водных растворов соляной, уксусной, янтарной кислот – соответственно солевой формы хитозана в композиции на общее время свертываемости крови. Результаты экспериментов представлены в таблице 11.

Следует отметить, что во всех случаях для приготовления растворов хитозана и, соответственно, перевода его в солевую форму, соответствующие кислоты использовали в минимальных концентрациях, достаточных лишь для растворения полисахарида в воде.

Время начала свертывания крови в контроле после забора крови у экспериментальных животных – без введения кровоостанавливающего средства составило 85 с (таблица 11). Общее время свертывания крови и образование тромба – 156 с.

Уксуснокислая форма хитозана в композиции приводит к существенному увеличению как начала, так и общего времени свертывания крови даже против контроля (почти в 2 раза). Известно, что уксусная кислота нарушает структурную организацию цитоплазматических мембран клеток крови и, соответственно, приводит к нарушению матричных процессов свертывания крови. С другими кислотами начало свертывания и общее время гемостаза практически одинаково и составляет ~45 с. Однако, неорганические кислоты (HCl) не являются естественными метаболитами некоторых клеток крови и стенок сосудов, поэтому при одинаковой скорости свертывания целесообразным является использование янтарной кислоты, тем более что янтарная кислота является естественным энергетическим субстратом клеток.

Известны случаи с нарушением свертываемости крови в организме, обусловленным понижением количества тромбоцитов (гемофилия) или отсутствием хотя бы одного из факторов свертываемости крови. Поэтому дополнительно в опытах *in vitro* исследовали кровоостанавливающее действие композиции – сукцината хитозана, комплексно связанного с ионами кальция – в условиях моделирования нарушения свертываемости крови (цитратная кровь). Цитрат натрия используют в экспериментальной биологии и медицине при

консервации крови, поскольку цитрат-ион образует недиссоциирующие комплексы с кальцием в крови, прерывая таким образом процесс свертывания крови. [152].

На рисунке 30 приведена зависимость общего времени свертываемости цитратной крови от концентрации ионов кальция. Видно эффективное гемостатическое действие композиции (рисунок 30, 1) даже на цитратной крови, несмотря на то, что для этого потребовалась более высокая концентрация ионов кальция чем в условиях относительной нормы. Наиболее существенное снижение времени свертывания цитратной крови - 20 с - достигалось при концентрации ионов кальция порядка 100 ммоль/л.

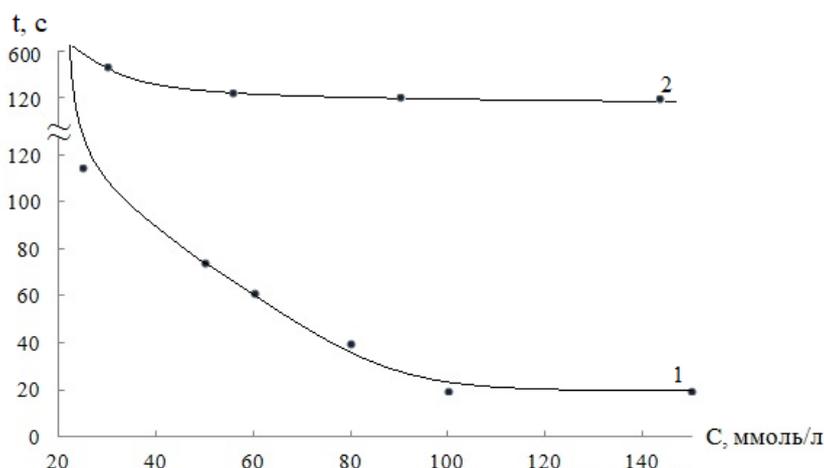


Рисунок 30. Зависимость общего времени свертывания цитратной крови от концентрации ионов кальция. **1** – действие кровоостанавливающей композиции, **2** – действие водных растворов соли кальция

В специальных опытах показано, что без хитозановой матрицы водные растворы солей кальция сворачивают цитратную кровь лишь за 180 с (рисунок 30, 2).

Полученные результаты позволяют сделать два вывода.

1). Водные растворы солей кальция обеспечивают свертываемость цитратной крови за 180 с независимо от концентрации ионов Ca^{2+} во всем изученном их диапазоне.

2). Композиция на основе сукцината хитозана, комплексно связанного с ионами кальция, обеспечивает свертываемость крови как цельной, так и цитратной крови за 20-40 с.

Высокая эффективность композиций на основе хитозана в растворах соляной и янтарной кислот, комплексно связанных с ионами кальция, подтвержденная в опытах *in vitro* по определению времени свертывания как цельной, так и цитратной крови, позволяет использовать их в качестве базовой основы при разработке кровоостанавливающих материалов. Хитозан в кровоостанавливающей композиции выполняет функцию матрицы, кроме того, он обеспечивает повышенную вязкость растворов, что очень важно при остановке кровотечений в живом организме.

Исследование эффективности кровоостанавливающей композиции в опытах in vivo.

Исследование кровоостанавливающих свойств различных композиций хитозана, содержащих ионы кальция, в опытах *in vivo* проводили на предварительно наркотизированных лабораторных животных – нелинейных белых крысах массой ~ 200-220 г. В качестве наркоза использовали диэтиловый эфир.

В ходе испытаний исследовали время остановки венозного и артериального кровотечений животных при действии кровоостанавливающей композиции. Был расширен спектр органических кислот и солей кальция. В качестве растворителей хитозана использовали: соляную, янтарную, никотиновую, аскорбиновую, бензойную, молочную и L-аспарагиновую кислоты, которые синтезируются в живых системах. Источниками ионов кальция были выбраны хлорид, глюконат и глицерофосфат кальция. Концентрация хитозана была постоянной – 3 мас. %. В связи с тем, что опыты были поставлены как на венозной, так и на артериальной крови, в последнем случае из-за высокого давления тока крови в испытаниях столкнулись с сильным разбавлением и частичным смыванием композиции при использовании ее в форме раствора. В связи с этим концентрацию ионов кальция в составе увеличили до 50 и 100 ммоль/л. Кроме того, для уменьшения эффекта

«смывания» кровоостанавливающего средства в форме раствора, на основе базового состава была разработана и апробирована композиция в виде геля трехмерной структуры, более устойчивого к смыванию при обильных кровотечениях. Кроме того, трехмерная структура кровоостанавливающего средства в большей степени, чем раствор с линейными цепями хитозана, моделирует структуру мембран клеток крови.

Во всех опытах *in vivo* применялась следующая методика эксперимента. Испытание кровоостанавливающих композиций различного состава выполнялось на 5 наркотизированных животных. У каждого из них препарировали кожный лоскут с левого бедра размером примерно 2x2 см, обнажая бедренные вену и артерию, надрезали их скальпелем. Сразу после начала кровотечения на рану наносили композицию и по секундомеру засекали время до полной его остановки (образования тромба) (табл). В контрольных опытах определяли общее время свертывания крови у животных, которым на раневую поверхность не наносили кровоостанавливающее средство. Среднее время остановки венозного и артериального кровотечения в контрольной группе животных составило ~ 130 с.

Таблица 12. Показатели свертывания крови в опытах *in vivo* при использовании кровоостанавливающих композиций на основе хитозана в водных растворах различных кислот, содержащих ионы кальция

* - в таблице приведены испытания гелевой формы композиции

| Композиции на основе хитозана | Время свертывания крови, 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 |
| *Гель: Никотиновая кислота + 50 ммоль/л глюканата | 35±3 |

| | |
|--|------|
| кальция | |
| Аспарагиновая кислота + 50 ммоль/л глюконата кальция | 85±5 |
| *Гель: Аспарагиновая кислота + 50 ммоль/л глюконата кальция | 57±3 |
| Аспарагиновая кислота + 50 ммоль/л глицерофосфата кальция | 36±1 |
| *Гель: Аспарагиновая кислота + 50 ммоль/л глицерофосфата кальция | 32±1 |
| *Гель: Янтарная кислота + 50 ммоль/л глицерофосфата кальция | 40±3 |
| *Гель: Янтарная кислота + 50 ммоль/л глюконата кальция | 48±2 |

Во всех случаях использовали минимальную концентрацию кислоты, обеспечивающей растворимость хитозана. Эксперименты *in vivo* показали, что наряду с сукцинатом и хлоридом хитозана эффективным кровоостанавливающим действием обладают также композиции на основе солевых форм полисахарида, приготовленные с использованием аспарагиновой и никотиновой кислоты. Среднее время прекращения кровотечений в этих случаях колеблется в пределах от 35 до 40 с. Установленное влияние природы кислоты на процесс тромбообразования позволило предполагать, что время остановки кровотечения будет также зависеть от природы солевой формы ионов кальция. Результаты, представленные в таблице 12, подтверждают высказанное предположение. Наиболее эффективными прокоагулянтами оказались композиции, содержащие глицерофосфат кальция. Кровотечения останавливаются в более короткий срок при концентрациях ионов кальция в глицерофосфате вдвое меньших, чем с хлоридом - 50 ммоль/л против 100 ммоль/л.

Таким образом, используя различные солевые формы хитозана и варьируя природу соединений кальция можно регулировать скорость тромбообразования.

Как отмечалось выше, при сильных кровотечениях после нанесения на поверхность раны композиций в виде растворов, они частично смываются током крови, тем самым ослабляя гемостатический эффект. В связи с этим были получены композиции в форме геля, и исследовано их влияние на процессы тромбообразования. Гель трехмерной структуры получали, используя в качестве сшивающего агента глутаровый альдегид [153]. Это соединение применяется в

медицине как антибактериальный агент, а также в качестве сшивающего агента в составе кровезаменителей [154].

Формирование трехмерной структуры происходит при взаимодействии амино-группы хитозана и альдегидной группы сшивающего агента (рисунок 31).

Гели, благодаря своей высокой вязкости, не смываются током крови с поверхности раны, вследствие чего время остановки кровотечения сокращается с 36 с до 32 с в сравнении с растворами (таблица 12).

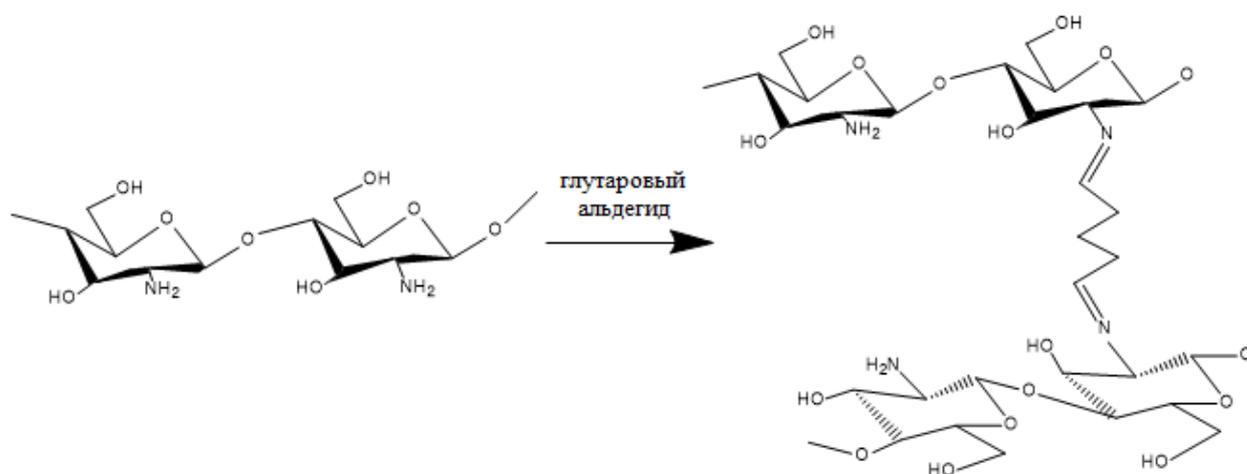


Рисунок 31. Схема образования сшитой структуры хитозана

Совокупность полученных результатов показывает, что хитозан с сорбированными на нем ионами кальция в процессе свертывания крови проявляет себя как аналог мембран клеток крови, выполняя функцию матрицы для адсорбирующихся на ней белков-факторов свертывания крови. Наиболее эффективными в составе композиции проявили себя солевые формы хитозана на основе соляной, янтарной, никотиновой и L-аспарагиновой кислот, а из соединений кальция - глицерофосфат. Итогом исследований явилась разработка кровоостанавливающей композиции в виде геля трехмерной структуры на основе модифицированного хитозана, с координированными на нем ионами кальция - природным компонентом тромбообразования (рисунок 32). Композиция в форме геля моделирует трехмерную структуру мембраны клеток крови, обеспечивая таким образом формирование комплексов хитозан-факторы свертывания крови. Она способствует ускоренному процессу остановки

кровотечения в сроки от 32 до 40 с против 2-3 мин в условиях нормы. 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. Проницаемость пленки была доказана на примере прохождения газовой смеси через мембрану на основе хитозана в хроматографических опытах. Была сконструирована приставка к газовому хроматографу, в которую зажимали мембрану и пропускали через нее газовую смесь из баллона. Кроме того, на экспериментальных животных показано, что такая пленка не требует снятия и обладает ранозаживляющим эффектом. 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 [155].



Рисунок 32. Образцы кровоостанавливающего и ранозаживляющего средства

По результатам исследований получены патент RU №2545991 «Кровоостанавливающий препарат» в 2015 г. и евразийский патент № 026104 «Кровоостанавливающее и ранозаживляющее средство» в 2016 г.

3.3.3. Доклинические исследования образцов кровоостанавливающего геля

Кровоостанавливающий гель различных составов был предоставлен для официальных доклинических испытаний в Нижегородскую государственную

медицинскую академию, в ходе которых было изучено токсическое действие препарата, а также рекомендованные ГОСТом показатели биохимического состава крови животных. Поскольку кровоостанавливающий гель планируется применять и при внешних повреждениях, и при проведении внутриполостных хирургических операциях, жесткость требований к средству возросла. Кровоостанавливающую композицию вводили как подкожно, так и внутримышечно инъекционно, и дополнительно перорально. При внутримышечном введении композиции наблюдали инкапсулирование и развитие локальных воспалительных процессов. Такой эффект, по-видимому, обуславливался существенным различием рН геля (5,2) и крови (7,3-7,4), приводящим к образованию нерастворимого комплекса хитозана с последующим его инкапсулированием. В связи с этим была проведена модификация кровоостанавливающей композиции заменой высокомолекулярного хитозана на его водорастворимые олигомерные формы со значением рН ~ 6,8-7,0, близким к тканевой жидкости. При использовании такой композиции временные показатели свертывания крови сохранялись, как и у исходного кровоостанавливающего средства. Однако и в этом случае были получены отрицательные результаты. Внутримышечное введение раствора в объеме 5 мл на 250 г животного приводило к их 100% гибели. Можно полагать, что быстрое поступление раствора в кровь нарушало ее естественный баланс и служило причиной внутрисосудистого тромбообразования и гиперкальциемии. Вышеупомянутые негативные эффекты композиции явились основанием для дальнейшей ее модификации. Была разработана оригинальная рецептура кровоостанавливающего средства на основе олигомерной формы хитозана, комплексно связанного с ионами кальция, в форме геля, не вызывающая инкапсулирование в организме. Последний эффект по сравнению с высокомолекулярным хитозаном достигается за счет контролируемой биодеструкции матрицы на основе олигомерной формы (ноу-хау).

3.3.4. Разработка различных форм кровоостанавливающих средств на основе базовой композиции

Положительные результаты доклинических испытаний послужили основанием для разработки специфических форм кровоостанавливающей композиции в зависимости от характера раневой поверхности. Высокая эффективность композиции определяет возможности ее применения в широкой области – от бытовых порезов до внутриполостных операций. Кровоостанавливающие гели, свойства которых описаны выше, наиболее эффективны при использовании на ранах неправильной формы – глубоких порезах, укусах животных и т.п. В случае пролежней, ожогов и при пересадке кожи более удобно применять как кровоостанавливающие гели, так и пленки. При глубоких ранениях с обильными кровотечениями, требующими прижима, эффективно использовать кровоостанавливающие губки, способные наряду с основным эффектом впитывать кровь и экссудат.

Получение кровоостанавливающей композиции в форме пленки.

Материалами для закрытия ран на протяжении многих лет служат марля и вата. Известно, что, несмотря на их защитные свойства, воздухопроницаемость и хорошее влагопоглощение, под повязками часто развиваются инфекционные воспаления, а смена перевязочного материала травмирует грануляционную ткань и вызывает боль. В связи с этим, последние три десятилетия проводятся разработки альтернативных перевязочных материалов, которые бы обладали целым рядом преимуществ – были биосовместимыми, атравматичными, предотвращали инфицирование раневой поверхности, эффективно впитывали экссудат, сохраняли газообмен между раной и атмосферой и оптимальную влажность раневой поверхности. В качестве полимерных материалов, удовлетворяющих этим требованиям, были предложены, например, коллагеновые повязки, в частности покрытие «Коллахит» (Патент RU № 2108114 с приоритетом от 27.12.1996 г.), полиуретановые повязки, повязки с гемостатическим эффектом, содержащие цеолит (QuikClot® ACS™ (Z-Medica, Wallington, CT)) и хитозан (RU №2519220. Местное гемостатическое средство, опубл 10.04.2014 г.). На наш

взгляд, эти материалы имеют ряд недостатков, которые проанализированы в литературном обзоре. QuikClot содержащий в своем составе каолин/цеолит в виде порошка, травмирует края раны, твердая композиция неполно контактирует с раневой поверхностью, кроме того при нанесении на рану возможен ее локальный разогрев. «Коллахит» и полиуретановые повязки не обладают собственно кровоостанавливающим действием, а гемостатический эффект возникает только за счет прижима. Таким образом, актуально создание покрытия для раны, обладающего всеми вышеперечисленными положительными свойствами и при этом останавливающего кровотечения. Такими покрытиями могут служить пленки, полученные на основе разработанной базовой композиции высокомолекулярного хитозана, комплексно связанного с ионами кальция. Пленки получали формованием из исходного кровоостанавливающего раствора на лавсановую подложку с последующей сушкой в условиях равномерного испарения растворителя до постоянной массы при температуре 25 °С с последующим вакуумированием при $T = 30$ °С в течение 3 ч. Использование таких пленок предполагает определенный уровень прочности и эластичности. Поэтому при их получении были использованы биосовместимые пластифицирующие добавки. Проверка в опытах *in vivo* на экспериментальных животных показала, что пленки обладают высокими кровоостанавливающими свойствами на уровне гелей. Время остановки кровотечений при их нанесении составило порядка 35-40 с. Кроме того, как было описано выше, пленки являются воздухопроницаемыми.

Усредненная кривая физико-механических испытаний по результатам измерений 10 образцов пленки представлена на рисунке 33 (кривая 1). Предел прочности на разрыв кровоостанавливающих пленок составляет 30 МПа, эластичность материала - 39,5%. Таким образом, в сочетании с вышеперечисленными биосовместимыми, кровоостанавливающими, воздухопроницаемыми свойствами, такая пленка обладает достаточным уровнем свойств, необходимых для гемостатических перевязочных материалов.

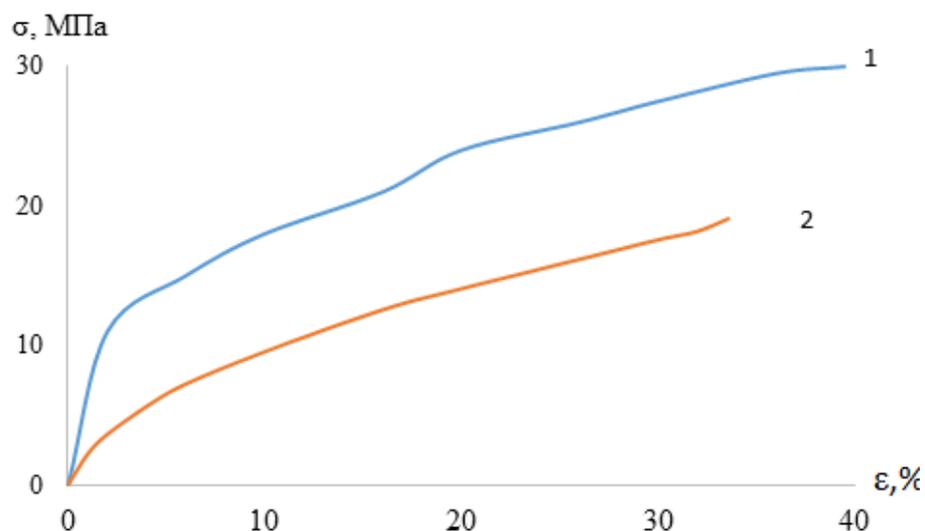


Рисунок 33. Физико-механические свойства кровостанавливающих пленок
1 – до радиационной стерилизации, 2 – после стерилизации

Использование кровостанавливающих материалов на практике предполагает обязательную их стерилизацию. Из всех возможных способов стерилизации – термическая, химическая, плазменная, озоновая, радиационная – последняя имеет ряд преимуществ. При стерилизации с помощью ионизирующего γ -излучения не происходит изменения структуры полимера, и нет необходимости освобождать материал от продуктов возможного воздействия составляющих его компонентов со стерилизатором, что могло бы произойти при химической стерилизации.

Естественно, при этом возникает вопрос о влиянии γ -облучения на физико-механические свойства кровостанавливающих пленок. Результаты проведенных испытаний представлены на рисунке 33 (кривая 2) (усредненная кривая на основании измерений по 10 образцам).

Выявлено, что после γ -стерилизации эластичность материала изменяется незначительно – с 39,5% до 33,5%, в то время как предел прочности на разрыв пленок снижается на 40% - с 30 МПа до 19 МПа. Прочностные характеристики пленок после стерилизации позволяют применять их в дальнейшем.

Следует отметить, что пленка, обладая кровостанавливающим действием, также имеет ряд дополнительных положительных свойств – не требует перевязки, надежно защищает рану в течение всего времени эпителизации, а, биодиградируя

под действием протолитических ферментов, образуются продукты, которые выступают в качестве энергетического и пластического материала при заживлении. На экспериментальных животных показано ускоренное заживление раневой поверхности в два раза. Такую пленку перспективно использовать, при закрытии донорских ран при пересадке кожи.

В экспериментах *in vivo* показана эффективность кровоостанавливающего и ранозаживляющего действия пленки, после срезания участка кожи наркотизированного экспериментального животного (рисунок 34). 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 34. Испытание кровоостанавливающей пленки *in vivo*

Получение кровоостанавливающей композиции в форме губки.

При обильных кровотечениях целесообразно применять не гели и пленки, а объемные материалы в виде губок, которые бы наряду с кровоостанавливающим действием, тампонировали рану, поглощали кровь и экссудат и, при отсутствии токсичности, не оказывали травматического действия при нанесении. Для изготовления таких губок рационально использовать пенополиуретановую основу, позволяющую в широких пределах варьировать их органо-лептические свойства и мягкость за счет введения в состав различных модифицирующих компонентов. Полиуретановые губки могут формироваться с открытыми и закрытыми порами, которые будут определять их впитывающую способность.

Известна двухкомпонентная гелеобразная композиция «Сарэл» [156] на базе полиола и изоцианата, образующая при нанесении на рану пенополиуретановую

губку. Ее используют для закрытия ран, трофических язв и ожогов, а заявляемый авторами кровоостанавливающий эффект достигается только за счет плотного прижима повязки к раневой поверхности (тампонирования). Недостатком губки «Сарэл» является ограниченное влагопоглощение вследствие структуры с закрытыми порами. Кроме того, поскольку композиция двухкомпонентна, повязка на ее основе готовится непосредственно перед использованием, вследствие чего теряется время, необходимое для остановки обильных кровотечений, а в процессе ее образования на ране возможен локальный перегрев.

В данной работе губка была разработана из трехкомпонентной системы – базовой кровоостанавливающей композиции на основе модифицированного хитозана, комплексно связанного с ионами кальция, полиола и изоцианата. В составе использовали как высокомолекулярные, так и олигомерные формы модифицированного хитозана. Мы предполагали, что ОН-группы хитозана, как и полиола, будут участвовать при формировании трехмерной сетки губки. Соотношение компонентов варьировали в широких пределах. Компоненты тщательно перемешивали и наносили на лавсановую подложку, после чего в течение одной минуты образовывалась губка.

Кровоостанавливающие свойства губок проверяли в опытах *in vivo* на 5 предварительно наркотизированных экспериментальных животных. У каждого из них препарировали кожный лоскут с левого бедра размером примерно 2x2 см, обнажая бедренные вену и артерию, надрезали их скальпелем. Сразу после начала кровотечения к ране прижимали губку. Время засекали по секундомеру. Поскольку губка в отличие от пленки и геля непрозрачна, для фиксирования момента образования тромба и остановки кровотечения, через разные интервалы времени губку снимали с раны. Среднее время свертывания крови составило ~ 30 с.

Губки, полученные на основе базовой кровоостанавливающей композиции, содержащей немодифицированный сополимеризацией хитозан, получались невысокими, плотными, с плохой впитывающей способностью. Для получения «рыхлой» структуры с открытыми порами был использован модифицированный

хитозан – его привитой сополимер с ГЭМА. С одной стороны цепи ГЭМА, содержащие ОН-группы, обеспечивают сшивку, наряду с полиольным компонентом взаимодействуя с изоцианатом. С другой стороны, привитые цепи ГЭМА работают как распорки, препятствуя сильным межмолекулярным взаимодействиям хитозана. Предполагаемая схема формирования трехмерной структуры представлена на рисунке 35.

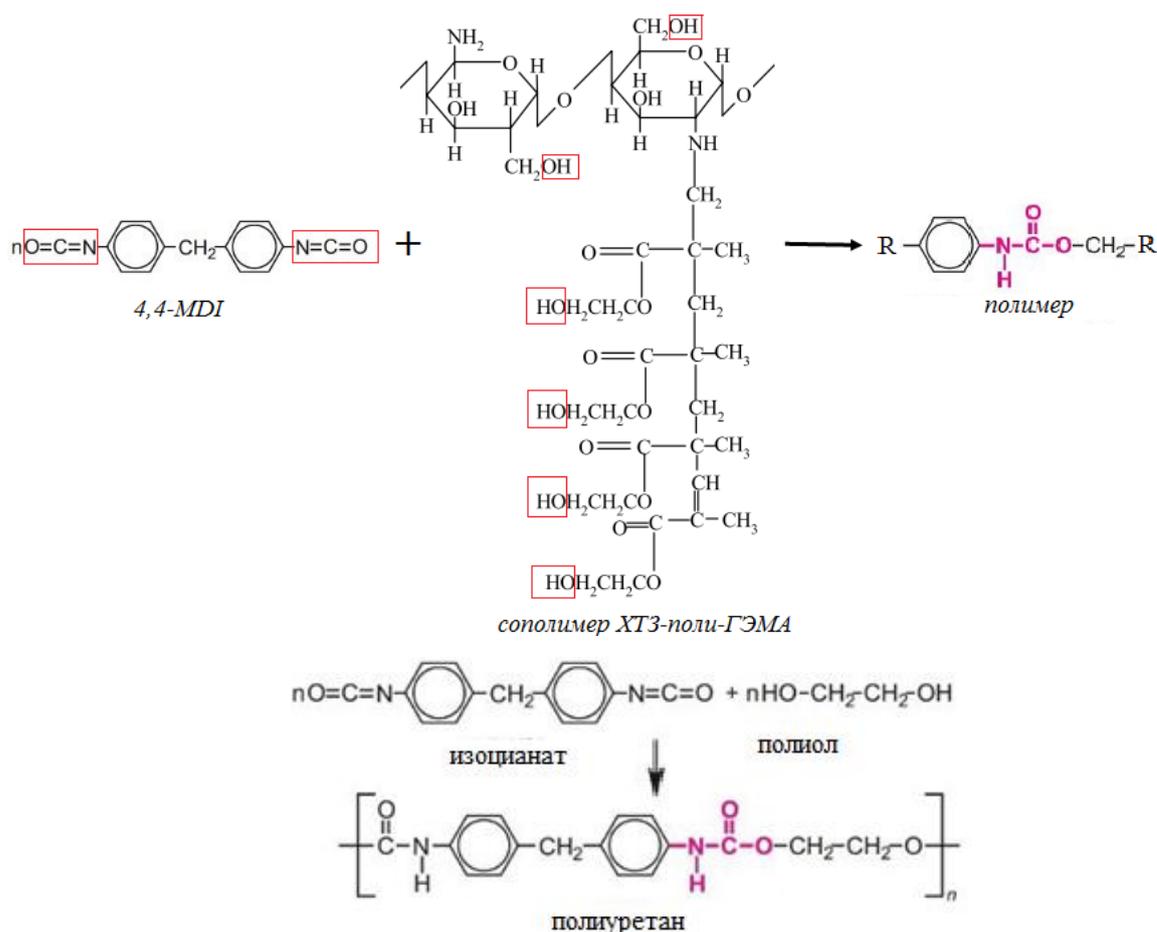


Рисунок 35. Схема взаимодействия сополимера хитозан-ГЭМА и полиола с изоцианатом

Исследования привели в итоге к получению губки, концентрация и состав компонентов в которой обеспечивают как кровоостанавливающее действие, так и высокую способность материала впитывать кровь и экссудат. Конкретная рецептура составляет предмет ноу-хау.

Результаты по определению впитывающей способности кровоостанавливающей губки представлены на рисунке 35 и рисунке 36. Для сравнения представлены данные по впитывающей способности губки «Сарэл»,

предоставленной фирмой «Локус». Измеряли высоту поднятия жидкости в образцах в течение 20 мин и степень их набухания. Губки помещали в физиологический раствор и сравнивали влагопоглощение. Было обнаружено, что высота подъема физиологического раствора в кровоостанавливающей губке составила 20 мм, в то время как в губке «Сарэл» всего лишь 6 мм (рисунок 36).

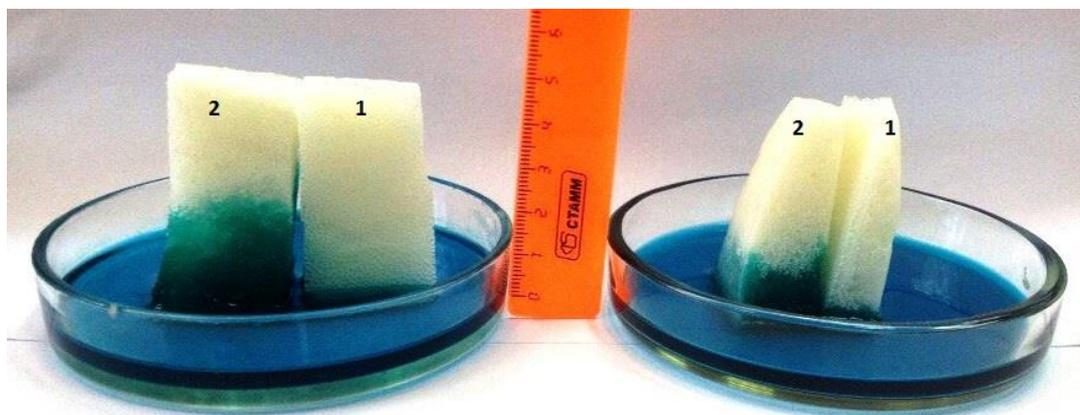


Рисунок 36. Степень впитываемости по высоте поднятия физиологического раствора в губке «Сарэл» (1) и кровоостанавливающей губке (2)

На рисунке 37 представлена кинетика набухания жидкости во времени для губки «Сарэл» (1), кровоостанавливающей губки (2).

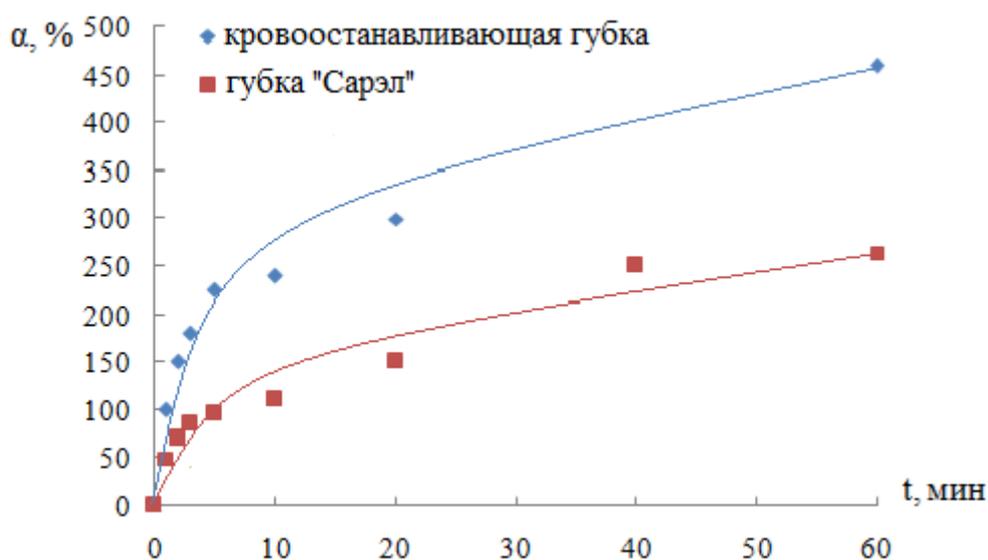


Рисунок 37. Степень набухания губки во времени

Существенно, что губка, содержащая сополимер хитозан-полиГЭМА, комплексносвязанный с ионами кальция, характеризуется высокой скоростью

впитывания физического раствора в именно первую минуту. В этом отношении она превосходит губку «Сарэл» в 5 раз, что имеет очень важное значение с точки зрения ее практического использования. Такой эффект по-видимому обусловлен различием в структуре губок (рисунок 38).

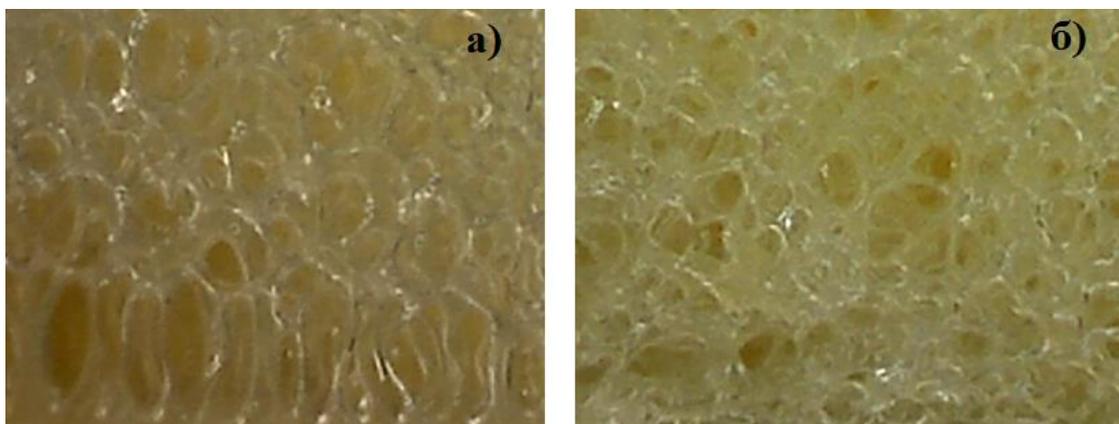


Рисунок 38. Микрофотография пор: **а** – губки «Сарэл»; **б** – кровоостанавливающей губки

Губка «Сарэл» характеризуется неоднородной ячеистой структурой с закрытыми порами, вытянутыми и расположенными монослоем у основания, а далее - различными по размерам. Жидкость в основном заполняет открытый нижний монослой пор, а дальше внутрь губки двигается плохо. В кровоостанавливающей губке структура более однородная, средний размер пор – 0,7 мм. Эта губка имеет открытые поры, образующие объемную сеть через систему сообщающихся капиллярных каналов. Структуры такого типа характеризуются чрезвычайно высокой скоростью впитывания жидкости [157].

В итоге была разработана оригинальная губка, содержащая хитозан-поли-ГЭМА, комплексносвязанный с ионами кальция, эффективно впитывающая кровь и экссудат, вызывающая остановку кровотечения на месте повреждения в срок 30-40 с, биосовместимая, не токсичная, воздухопроницаемая, не вызывающая болезненных ощущений при наложении.

При всех достоинствах кровоостанавливающих материалов остается задача придания им бактерицидных свойств, чтобы предотвратить или купировать развитие инфекций в ранах. Методом решения может быть введение в матрицу хитозана наночастиц серебра.

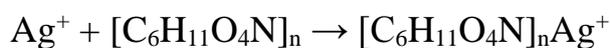
3.4. Дисперсии наночастиц серебра, стабилизированные хитозаном

3.4.1. Получение дисперсий и исследование их свойств

Как отмечалось в литературном обзоре, в последние десятилетия НЧ серебра, благодаря своей эффективной антибактериальной, противовирусной, противогрибковой активности, вызывают все больший интерес у исследователей в связи с ростом резистентности микроорганизмов к антибиотикам, и развитием устойчивых штаммов бактерий [103]. Существуют различные способы синтеза НЧ. НЧ серебра в основном получают с помощью химических реакций, ультразвукового, микроволнового, УФ-, гамма- и электронного облучения [160-164]. Совокупность физических методов получения НЧ позволяет исключить введение специальных восстановителей и дополнительную очистку НЧ и могут быть отнесены к методам зеленой химии. Среди указанных методов наиболее доступным в плане экспериментальной реализации является метод УФ-индуцированного восстановления ионов серебра. В зависимости от дальнейшего применения необходимо тщательно подходить к выбору стабилизатора НЧ, удовлетворяющего поставленным задачам. Среди широкого круга полимерных матриц, которые используют для эффективной стабилизации НЧ различной природы, в последнее время исследователи все больше внимание уделяют хитозану. Хитозан в силу высоких хелатообразующих и сорбционных свойств способен выступать эффективным стабилизирующим агентом НЧ, как было показано в работах [131, 133, 134].

На нашей кафедре разработан оригинальный метод получения НЧ золота путем УФ-индуцированного восстановления Au^{3+} из прекурсора – $HAuCl_4$, находящегося в воднокислотном растворе хитозана без введения дополнительных восстановителей. Эта методика была использована в данной работе при получении НЧ серебра из прекурсора $AgNO_3$. НЧ серебра формируются непосредственно в матрице хитозана. Свойства дисперсий НЧ серебра, стабилизированных хитозаном, исследовали различными методами: УФ-, ИК-спектроскопией, РМУ, DLS, ELS, ДСК, РФА, АСМ.

При введении AgNO_3 в раствор хитозана, электроположительные ионы серебра могут быть адсорбированы макромолекулами хитозана за счет электростатических (ион-дипольных) взаимодействий с атомами кислорода гидроксильных и простых эфирных групп хитозана [165].



Анализируя образование НЧ серебра в растворах триэтилентетрамина, авторы [132] приписывают ключевую роль в реакции восстановления ионов Ag^+ амино-группам. Прямые доказательства, которые подтверждают это предположение, отсутствуют. Тем не менее, исследователи [131], рассматривающие образование комплекса НЧ серебра с хитозан-силановыми гибридами, также считают, что процесс комплексообразования с НЧ происходит благодаря участию амино-групп хитозана, содержащих свободные электронные пары.

Поскольку в данной работе образование НЧ серебра происходит в растворах хитозана, в которых при УФ-воздействии возможна частичная деструкция цепей полисахарида, в процессе восстановления ионов серебра нельзя исключить участие как альдегидных групп хитозана по реакции Толленса, так и непротонированных амино-групп.

Для стабилизации НЧ серебра в работе использовали растворы хитозана с различными ММ. Кинетику формирования НЧ серебра в растворах хитозана контролировали спектрофотометрически по появлению и нарастанию интенсивности полос поглощения, соответствующей плазмонному резонансу НЧ серебра - $\lambda \sim 380\text{-}480$ нм. Следует отметить, что для всех систем с различными ММ полимера-стабилизатора кривые полос плазмонного поглощения носят однотипный характер и отличаются лишь положением максимумов. Для иллюстрации на рисунке 39 представлены спектры поглощения при формировании НЧ серебра в растворе хитозана ММ 0.83×10^5 и концентрации НЧ серебра – 0,01 мас. %.

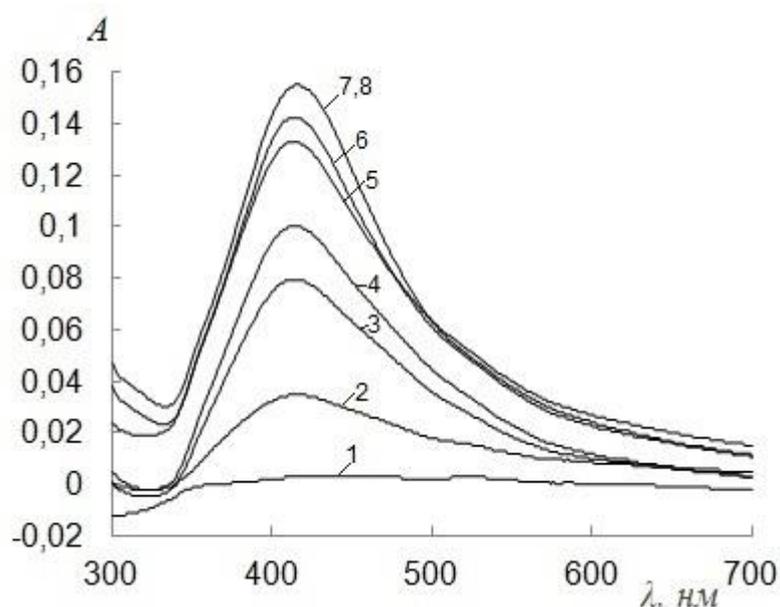


Рисунок 39. Возникновение и нарастание во времени полосы плазмонного поглощения НЧ серебра при формировании их в уксуснокислом растворе хитозана при УФ-облучении: кривая **1** – 0, **2** – 20, **3** – 40, **4** – 60, **5** – 80, **6** – 100, **7** – 120, **8** – 140 мин. $t = 30^\circ\text{C}$. ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%

В таблице 12 приведены значения длин волн максимумов полос поглощения НЧ серебра, стабилизированных хитозаном с различной ММ.

Таблица 12. Значение длин волн максимумов полос поглощения НЧ серебра при различных ММ хитозана ($\text{pH} = 4,8$), ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%

| ММ хитозана | Длина волны, нм |
|--------------------|-----------------|
| 0.40×10^5 | 424 |
| 0.83×10^5 | 420 |
| 1.10×10^5 | 415 |
| 1.27×10^5 | 412 |
| 1.65×10^5 | 400 |
| 2.00×10^5 | 387 |
| 2.40×10^5 | 383 |

Из данных таблицы 12 видно, что с увеличением ММ хитозана при сохранении постоянной массовой концентрации полисахарида, прекурсора и рН среды наблюдается смещение положения максимума полос поглощения НЧ серебра в коротковолновую область. Известно [166], что чем больше значение длины волны максимума полосы плазмонного поглощения НЧ, тем больше их размер. На основании этого, исходя из результатов спектрофотометрических испытаний, можно заключить, что на среднее значение размера НЧ серебра влияет ММ хитозана-стабилизатора. Чем она больше, тем меньше средний размер НЧ серебра. Результаты спектральных измерений подтверждаются данными РМУ по определению средних размеров НЧ серебра, стабилизированных хитозаном для образцов с предельно отличающимися ММ последнего – $0,4 \times 10^5$ и $2,4 \times 10^5$, концентрация прекурсора в растворе - 2×10^{-3} моль/л, рН = 4,8. Средние размеры НЧ составили ~ 12 нм и ~ 8 нм соответственно (рисунок 40).

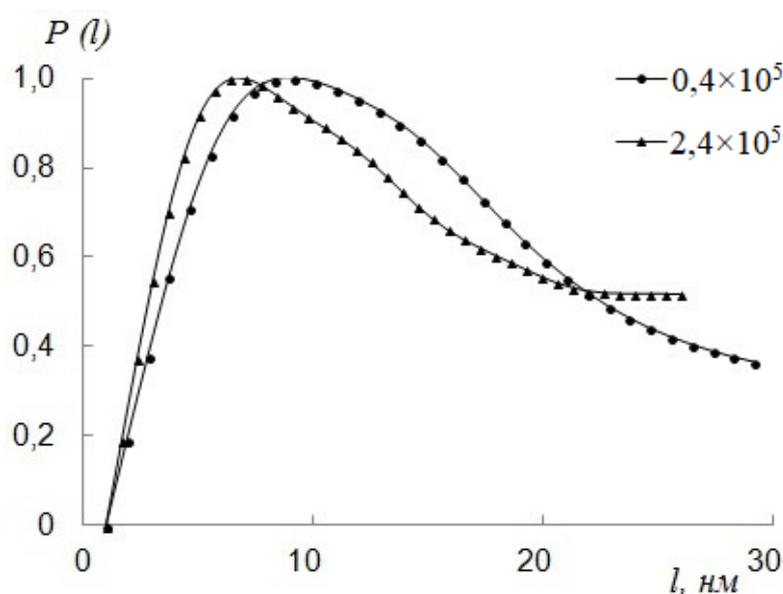


Рисунок 40. Функции распределения по размерам НЧ серебра, при их стабилизации в растворах хитозана с различными ММ; рН 4,8,
 $\omega(\text{НЧ Ag}) = 0.01 \text{ мас.}\%$

Таким образом, изменение ММ хитозана позволяет регулировать средний размер НЧ серебра, причем с увеличением ММ полисахарида их средний размер уменьшается. Полученные результаты о влиянии ММ на размерные характеристики НЧ хорошо согласуются с результатами по другим системам НЧ -

полимер-стабилизатор и отражают общую тенденцию в полимерных нанокompозитах.

Выше рассмотрено формирование НЧ серебра в растворе полисахарида при $pH = 4,8$, когда полимерные цепи находятся в спиральной конформации. Рассмотрим влияние pH среды (а соответственно и конформационного состояния полимера) на размерные характеристики макромолекул хитозана, комплексно связанных с НЧ серебра, полученных с использованием методов спектрофотометрии и ДСК.

На рисунке 41 представлены спектры полос плазмонного поглощения дисперсий НЧ серебра при различных pH среды и ММ полимера-стабилизатора: $1,10 \times 10^5$ и $2,20 \times 10^5$.

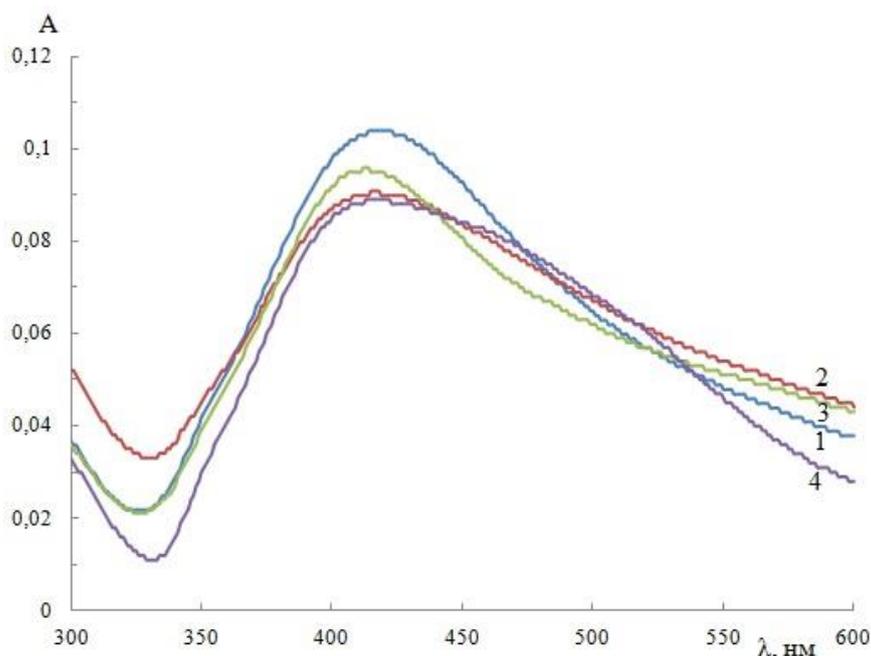


Рисунок 41. Спектры полос плазмонного поглощения НЧ серебра при формировании их из допанта $AgNO_3$ в уксуснокислом растворе хитозана при $pH = 4,8$ (кривые 1, 3) и $pH = 3,3$ (кривые 2, 4): 1,2 – ММ = $1,10 \times 10^5$, 3,4 – ММ = $2,20 \times 10^5$. ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%

Четко прослеживается смещение положения максимума полосы плазмонного поглощения НЧ серебра, стабилизированных хитозаном, в зависимости от конформационного состояния его макромолекул (рисунок 41, таблица 13). Для обеих систем, отличающихся ММ хитозана, максимум полосы

плазмонного поглощения смещается в более коротковолновую область, когда макромолекулы стабилизатора находятся в конформации клубка (pH = 3,3) относительно их положения в случае цепей полисахарида в спиральной конформации (pH = 4,8). Наблюдается зависимость и от ММ хитозана. С увеличением ММ стабилизатора, максимум также смещается в коротковолновую область.

Таблица 13. Значение длины волны максимума полосы поглощения НЧ серебра при различных pH среды и ММ хитозана. ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%

| ММ хитозана | Максимумы полос плазмонного поглощения НЧ серебра, нм | |
|----------------------------|---|----------|
| | pH = 4,8 | pH = 3,3 |
| $1,10 \times 10^5$ + НЧ Ag | 420 | 415 |
| $2,20 \times 10^5$ + НЧ Ag | 412 | 405 |

Смещение максимума полосы плазмонного поглощения отражает размерные характеристики НЧ серебра – чем в более коротковолновую область он смещается, тем меньше средние размеры НЧ в дисперсиях.

Таким образом, впервые показано, что средние размеры НЧ серебра зависят как от ММ хитозана-стабилизатора, так и от конформационного состояния его макромолекул. Размеры НЧ уменьшаются с увеличением ММ полисахарида и кислотности среды.

В работе впервые исследовано влияние НЧ серебра на свойства макромолекул стабилизатора. Следует оговориться, что в процессе УФ-индуцированного образования НЧ происходит снижение ММ цепей хитозана. Исследование динамической вязкости растворов хитозана до и после УФ-облучения показало снижение их вязкости с 74 сР до 54 сР в случае спиральной конформации макромолекул, и с 80 сР до 52 сР при конформации цепей – клубок. Снижение вязкости растворов полисахарида свидетельствует об уменьшении его ММ. В связи с этим растворы хитозана и дисперсии комплексов хитозан-НЧ серебра облучали УФ-светом одинаковое время, после чего определяли их

средние размеры методом DLS (таблица 14). ММ полимера в таблице приводятся после его УФ-облучения.

Таблица 14. Эффективный диаметр макромолекул хитозана и комплексов хитозан-НЧ серебра при различных рН

Полидисперсность $\sim 1,25$. ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%

| ММ хитозана | Эффективный диаметр, нм рН = 4,8 (конформация– спираль) | Эффективный диаметр, нм рН = 3,3 (конформация– клубок) |
|-----------------------------------|---|--|
| $1,10 \times 10^5$ | 623.9 | 536.9 |
| $1,10 \times 10^5 + \text{НЧ Ag}$ | 292.1 | 390.1 |
| $2,20 \times 10^5$ | 868.9 | 546.5 |
| $2,20 \times 10^5 + \text{НЧ Ag}$ | 295.4 | 415.3 |
| $8,78 \times 10^5$ | 2568.0 | - |
| $8,78 \times 10^5 + \text{НЧ Ag}$ | 636.0 | - |

Оказалось, что макромолекулы хитозана спиральной конформации в растворе в отсутствие НЧ серебра при одном и том же значении ММ имеют больший эффективный диаметр, чем в конформации клубка. На наш взгляд это обусловлено диффузионным вращением вытянутых в первом случае молекул, размер которых и регистрирует детектор. Образование комплекса полимер-НЧ во всех системах приводит к уменьшению размеров частиц по сравнению с соответствующими значениями макромолекул стабилизатора.

Обсуждая полученные результаты, следует отметить следующие моменты:

1. Размеры частиц комплексов для макромолекул хитозана в спиральной конформации меньше, чем для конформации клубка.

2. В случае спиральной конформации макромолекул хитозана при образовании комплекса с НЧ, происходит тем более существенное снижение размеров комплексов против исходной макромолекулы хитозана, чем больше ММ полимера.: эффективный диаметр в этом случае уменьшается в 2-3 раза – с 623.9 и 868.9 нм до 292.1 и 295.4 нм для ММ $1,10 \times 10^5$ и $2,20 \times 10^5$ соответственно. Размер

комплексов, сформированных в полимере с $MM = 8.78 \times 10^5$ ($pH = 4,8$), сокращается в 4 раза против исходного среднего диаметра макромолекул хитозана. Для макромолекул хитозана в конформации «клубок» тенденция к сжатию при стабилизации полимером НЧ также прослеживается, но не в столь сильной степени, как для спиральной конформации: в ~ 1.3 раза – с 536.9 и 546.5 нм до 390.1 и 415.3 нм соответственно.

3. Интересен факт, что размер частиц комплексов полимер-НЧ для макромолекул хитозана в спиральной конформации с вдвое отличающимися MM - $1,10 \times 10^5$ и $2,20 \times 10^5$ имеют почти одинаковый размер – 292.1 нм и 295.4 нм.

Возможной причиной такого поведения, наблюдаемого в последнем случае, является особенность стабилизации НЧ макромолекулами. Известно, что одна макромолекула может стабилизировать несколько НЧ. Можно предположить, что при большой длине спирали в ней формируется большее число частиц, и, соответственно, больше участков цепи участвует в их стабилизации, и она сжимается сильнее, чем макромолекулы меньшей MM . У макромолекул спиральной конформации меньшей длины, в которых формируется меньшее количество НЧ больших размеров, остаются «хвосты» - незадействованные в стабилизации НЧ серебра участки.

Таким образом, впервые показано существенное влияние НЧ серебра на размерные характеристики макромолекул хитозана при различных значениях MM и конформации цепей полимера. Макромолекула сжимается при образовании комплекса полимер-НЧ серебра, причем тем сильнее, чем выше MM хитозана и выше значение pH среды.

Встает вопрос о механизме стабилизации НЧ серебра полимером. Большинство авторов считают, что НЧ серебра стабилизируются амино- и гидроксильными группами хитозана. Подробно анализ этих работ приведен в литературном обзоре данной диссертации.

Чтобы подтвердить данное предположение, методом ИК-спектроскопии исследовали исходный полимер, а также композиты хитозана, содержащего НЧ серебра.

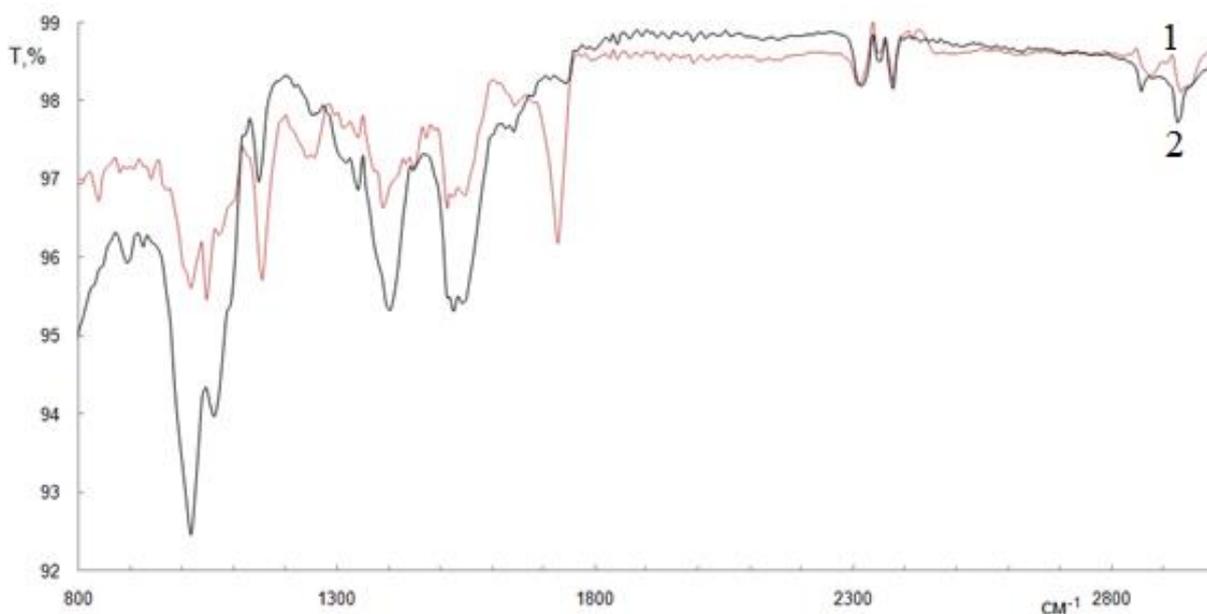


Рисунок 42. ИК-спектры хитозана (1) и композита хитозан-НЧ серебра (2)

Из рисунка 42 видно характерное смещение полос хитозана с 1712 см^{-1} до 1728 см^{-1} соответствующее колебаниям N-H амино-групп полисахарида, а также смещение полос в области $2800\text{-}3000\text{ см}^{-1}$, отвечающим колебаниям гидроксильных групп полимера на $\sim 14\text{ см}^{-1}$, свидетельствующие об их участии в стабилизации НЧ серебра. Вследствие этого можно предположить, что главными активными центрами комплексообразования с НЧ серебра в хитозане являются амино- и гидроксильные группы полисахарида.

Одной из задач при получении дисперсий НЧ является исследование их агрегативной устойчивости во времени. Известно, что дисперсную фазу золь металлов, формируемых в полимерах, можно рассматривать как комплексы полимер-НЧ, образующиеся благодаря нековалентным взаимодействиям разной природы: ван-дер-ваальсовым (гидрофобным), кулоновским, диполь-поверхностным [166]. Так как хитозан является поликатионитом, об агрегативной устойчивости дисперсий можно судить по величине электрокинетического потенциала (ξ). Известно, что критическое значение ξ -потенциала коллоидных частиц, определяющее начало их агрегации, составляет $25\text{-}30\text{ мВ}$ [142]. Методом ELS исследовано изменение величины ξ -потенциала дисперсий НЧ, стабилизированных хитозаном, во времени: в первые сутки после синтеза, спустя 2 недели и через 4 месяца. Полученные значения оставались практически

постоянными в пределах ~ 50 mV, что существенно превышает пороговое значение коагуляции (таблица 15).

Таблица 15. Эффективный диаметр и электрокинетический потенциал дисперсий НЧ серебра. рН среды = 4,8 и 3,3. Полидисперсность ~ 1.2 .

ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%

| Дисперсии НЧ серебра в 3 мас. % хитозане | Эффективный диаметр комплексов хитозан-НЧ серебра, нм | | Дзета-потенциал (метод ELS), mV |
|--|---|------------------------|---------------------------------|
| | 1-е сутки после синтеза | 4 месяца после синтеза | |
| ММ = $1,10 \times 10^5$ рН = 4,8 | 292 | 343 | + 50 |
| ММ = $2,20 \times 10^5$ рН = 4,8 | 295 | 315 | + 53 |
| ММ = $1,10 \times 10^5$ рН = 3,3 | 390 | 421 | + 49 |
| ММ = $2,20 \times 10^5$ рН = 3,3 | 415 | 547 | + 57 |

Наряду с методом ELS, используя метод DLS контролировали и изменение размеров комплексов. Несмотря на то, что величина ξ -потенциала со временем практически не меняется, согласно данным DLS, размер частиц спустя 4 месяца увеличивается (таблица 15). Это показывает, что величина электрокинетического потенциала не может являться однозначной характеристикой устойчивости дисперсной системы. По-видимому, следует учитывать 2 фактора стабилизации – электрокинетический и структурно-механический. Роль второго фактора со временем снижается. Но причины этого явления до сих пор не выявлены. Заявленные выше задачи по формированию НЧ серебра определили постановку исследований бактерицидных свойств материалов на основе хитозана, содержащих НЧ.

3.4.2. Исследование бактерицидных свойств дисперсий наночастиц серебра

Малые размеры образующихся НЧ серебра в растворах хитозана, а, следовательно, их высокая удельная поверхность, определили постановку исследований по изучению бактерицидной активности дисперсий. В литературе описаны бактерицидные свойства НЧ серебра, однако однозначная интерпретация их действия отсутствует. Предложено несколько теорий механизма бактерицидного действия НЧ серебра на микроорганизмы и их негативного влияния на рост биопленок на поверхности имплантированных материалов в живых организмах.

1). НЧ серебра способны физически взаимодействовать с поверхностью клеток различных бактерий, прилипая, накапливаясь на ней и вызывая структурные изменения, что особенно проявляется у грамотрицательных бактерий. Авторы [167] показали, что накопление НЧ на цитоплазматической клеточной мембране создает промежутки в целостности двойного слоя, который ведет к увеличению проницаемости и, наконец, к некрозу клетки бактерии. Из-за структурных различий в составе клеточных стенок грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов (рисунок 43), НЧ серебра оказывают на них различное бактерицидное действие.

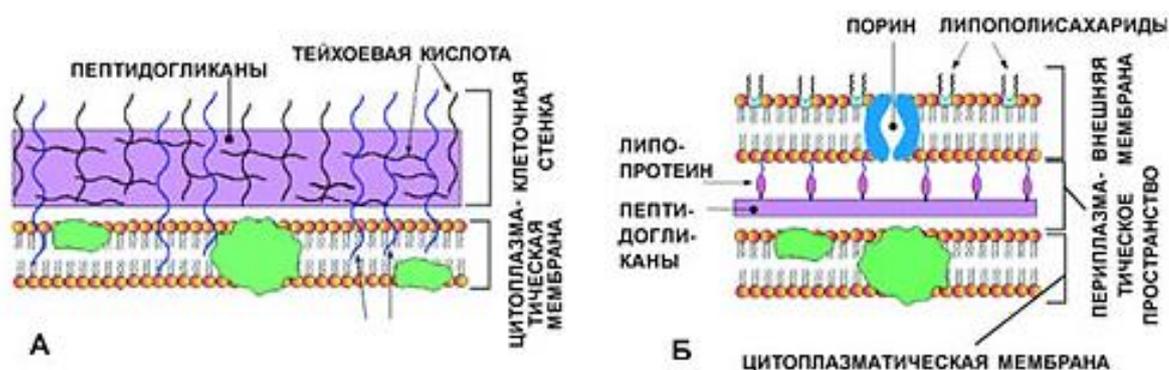


Рисунок 43. Модель строения клеточной стенки грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) бактерий

У грамотрицательных бактерий есть слой липополисахаридов на внешней стороне (рисунок 43), и существующий ниже тонкий слой пептидогликанов. Хотя липополисахариды составлены из липидов, ковалентно связанных с

полисахаридами, жесткость структуры отсутствует. НЧ серебра легко проникают в такую клеточную стенку, разрушая ее целостность. С другой стороны, клеточная стенка грамположительных бактерий, главным образом, составлена из толстого слоя (20 - 80 миллимикрон) пептидогликана, состоящего из линейных полисахаридных цепей, поперечно-связанных короткими пептидами, чтобы сформировать трехмерную твердую структуру. Жесткость и обширное поперечное соединение не только уменьшают количество мест для прикрепления НЧ серебра к клеточной стенке, но также делают саму стенку более труднопроницаемой.

2). Другая схема предложена авторами [168, 169]. НЧ серебра с размерами <30 нм, способны проникать внутрь бактерий. Повреждение мембраны сопровождается нарушением процессов окисления фосфорилирования (синтеза АТФ) и, как следствие, продуцированием активных форм кислорода. Таким образом, формируются свободные радикалы с сильным противобактерицидным действием.

3). Авторы [170] рассматривают антибактериальное действие НЧ серебра размером 1-10 нм за счет их способности проникать внутрь бактерии и взаимодействовать с серо- и фосфорсодержащими соединениями, такими как ДНК и, как следствие, блокировать генетический материал клетки, а также - инактивировать рибосомы. Это приводит к нарушению процессов синтеза белка, а значит и к дестабилизации состава внешней мембраны, вызывая некроз клетки. Этот механизм, однако, спорный, т.к. некоторые авторы считают, что НЧ не повреждают ДНК [171].

В целом, механизм бактерицидного действия нЧ серебра представлен на рисунке 44.

В свете изложенного принципиальным является изучение влияния размеров НЧ серебра в дисперсиях, стабилизированных хитозаном, на их бактерицидную активность. Результаты представлены в таблице 16.

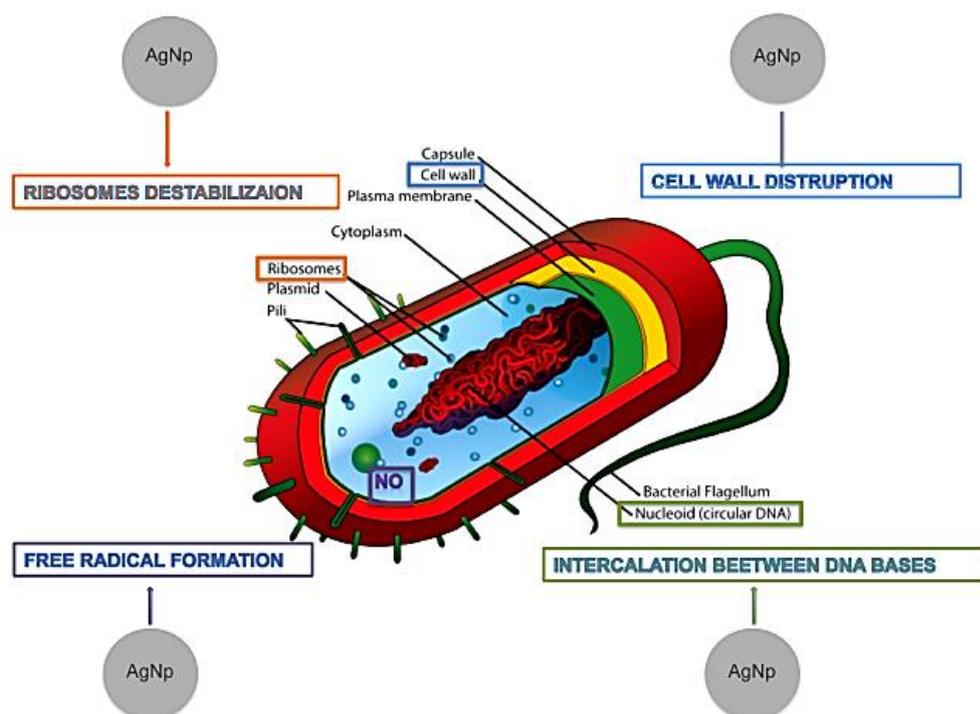


Рисунок 44. Механизм антибактериального действия НЧ серебра [172]

Таблица 16. Бактерицидная активность дисперсий НЧ серебра, стабилизированных хитозаном. ω (НЧ Ag) = 0,001% моль/л

** - растворы сравнения, не содержащие НЧ серебра

| ММ хитозана в растворах дисперсий НЧ | Длина волны максимума полосы поглощения НЧ серебра, нм | Средний размер НЧ Ag, нм | Зона ингибирования роста бактерий, R (мм) | | |
|--------------------------------------|--|--------------------------|---|---------------------------|-------------------------|
| | | | Escher. coli грам(-) | Pseudom. aerugin. грам(-) | Staphyl. aureus грам(+) |
| $2,40 \times 10^5$ | 383 | 8 | 6 | 3 | 2 |
| ** $2,40 \times 10^5$ | | | 1 | 0,5 | 0,5 |
| $1,27 \times 10^5$ | 412 | - | 5 | 2 | 2 |
| ** $1,27 \times 10^5$ | | | 1 | 0,5 | 0,5 |
| $0,83 \times 10^5$ | 420 | - | 4 | 2 | 2 |
| ** $0,83 \times 10^5$ | | | 0 | 0,5 | 0,5 |
| $0,40 \times 10^5$ | 424 | 12 | 3 | 1 | 1 |
| ** $0,40 \times 10^5$ | | | 0 | 0,5 | 0,5 |

Оказалось, что дисперсии НЧ серебра с размером НЧ ~ 8 нм, сформированные в растворах хитозана с более высокой ММ, проявляют ярко выраженную бактерицидную активность, что особенно четко прослеживается для бактерий вида *Escherichia coli* (грамотрицательная бактерия). Увеличение размера НЧ серебра всего лишь до 12 нм приводит к резкому снижению бактерицидной активности. Из таблицы 16. видно, что соответствующие растворы сравнения хитозана, не содержащие НЧ серебра, проявляют лишь бактериостатический эффект. Несмотря на то, что из литературных данных [9] известно, что хитозан проявляет бактерицидное действие, в изученных условиях этот эффект не выявлен.

Полученные результаты могут найти применение при создании кровоостанавливающих, ранозаживляющих материалов и материалов функционального назначения в виде растворов, гелей, губок и пленок. Введение НЧ серебра придает биомедицинским композициям эффективные бактерицидные свойства.

3.4.3. Исследование структурных и физико-механических свойств нанокompозитов

На основе дисперсий НЧ серебра, стабилизированных хитозаном, могут быть получены однородные и прозрачные пленки. В перспективе как научного интереса, так и практического использования нанокompозитов необходимым является определение температурных границ их применения, важных с точки зрения границ их рабочего температурного интервала эксплуатации, переработки и термостабильности композитов, а также их физико-механических свойств. Исследовано влияние различных концентраций НЧ серебра в твердых композитах на основе хитозана на их теплофизические характеристики.

Исследование теплофизических свойств образцов проводилось по стандартной методике, а именно, образцы перед каждым экспериментом прогревали в инертной среде при 120 °С в течение 30 минут, после охлаждали до

комнатной температуры и затем проводили их ДСК-исследование. Следует отметить, что хитозан во всех образцах находится в ацетатной форме.

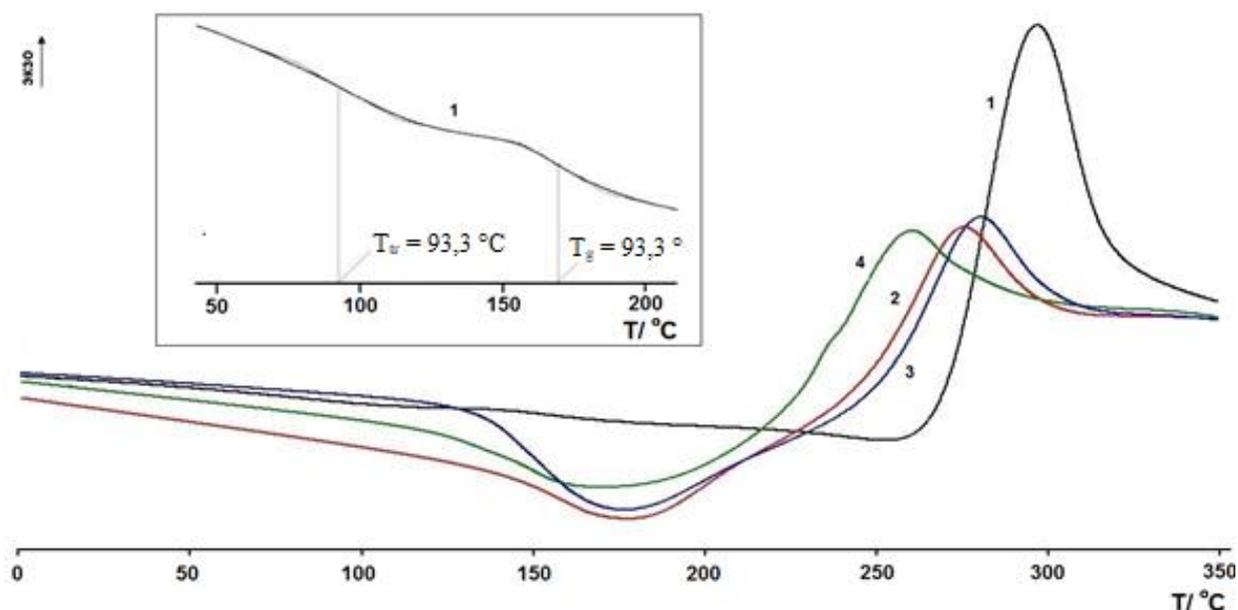


Рисунок 45. ДСК-кривые хитозана (кривая **1**) и его композитов, содержащих НЧ серебра в концентрациях (кривые 2-4): (**2**) – 0,0015 мас.%, (**3**) – 0,003 мас.%, (**4**) – 0,15 мас.%

Соответствующие температуры расстеклования (T_g) и начала термической деструкции (T_d) приведены в таблице 17. Для хитозана (рисунок 45, кривая **1**) проявляется β -переход в области 70 – 110°C и расстеклование в области 160 – 180°C. Первый переход T_{tr} обусловлен вибрацией пиранозного кольца вокруг гликозидной связи. Расстеклование происходит из-за изменения структуры хитозана, состоящей из аморфных и высоко упорядоченных частей.

Таблица 17. Теплофизические характеристики хитозана и его композитов, содержащих НЧ серебра. * Погрешность в определении составляет ± 0.5 °C

| № образца | Концентрация НЧ серебра в композите, мас.% | T_g , °C* | T_d , °C* |
|-----------|--|-------------|-------------|
| 1 | 0 | 170.3 | 298 |
| 2 | 0,0015 | 161.1 | 275 |
| 3 | 0,003 | 150.2 | 280 |
| 4 | 0,15 | 150.0 | 260 |

Обращает на себя внимание, что для композитов хитозана, содержащих НЧ серебра отчетливо наблюдается смещение температур расстеклования и начала термической деструкции в сторону меньших значений (рисунок 45, кривые 2-4). Значения T_g и T_d (таблица 17, рисунок 45) композитов, содержащих незначительные количества наночастиц серебра, в интервале изученных концентраций максимально снижаются на 20 и 38°C соответственно. По-видимому, это связано с участием функциональных групп хитозана в стабилизации наночастиц серебра, что исключает образование водородных связей между его цепями и, соответственно, формированию упорядоченных структур.

Экспериментальным подтверждением предположения являются данные РФА и АСМ. Различие в температурных переходах мы связываем с различной структурной организацией в образце. Методом РФА исследована структура пленок. На рисунке 45 приведены дифрактограммы пленок хитозана и его композита, содержащего НЧ серебра, полученных из соответствующих коллоидных растворов. Из дифрактограммы (рисунок 46, а) видно, что в пленке исходного хитозана наблюдаются как аморфное гало, так и кристаллические структуры. Присутствие НЧ приводит к почти полной ее аморфизации. По-видимому, это связано с участием функциональных групп хитозана в стабилизации НЧ серебра, что исключает образование в нем упорядоченных структур.

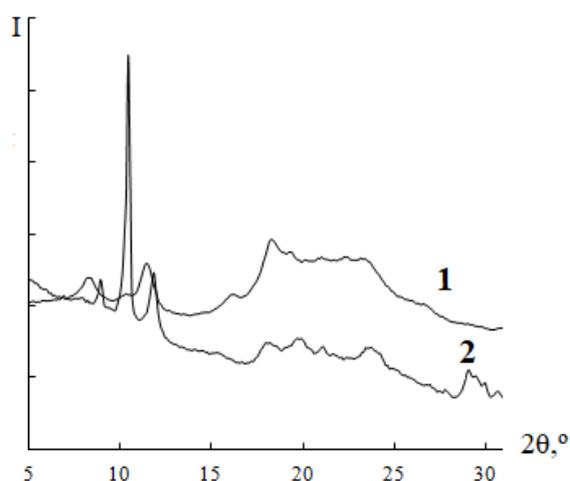


Рисунок 46. Дифрактограммы образцов хитозана (1) и композита на основе хитозана, содержащего 0,01 мас. % НЧ серебра (2)

Структурные различия проявляются и в топографии поверхности пленок, полученных из растворов хитозана с отличающимся конформационным состоянием макромолекул (рисунок 47). Пленки хитозана, 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.

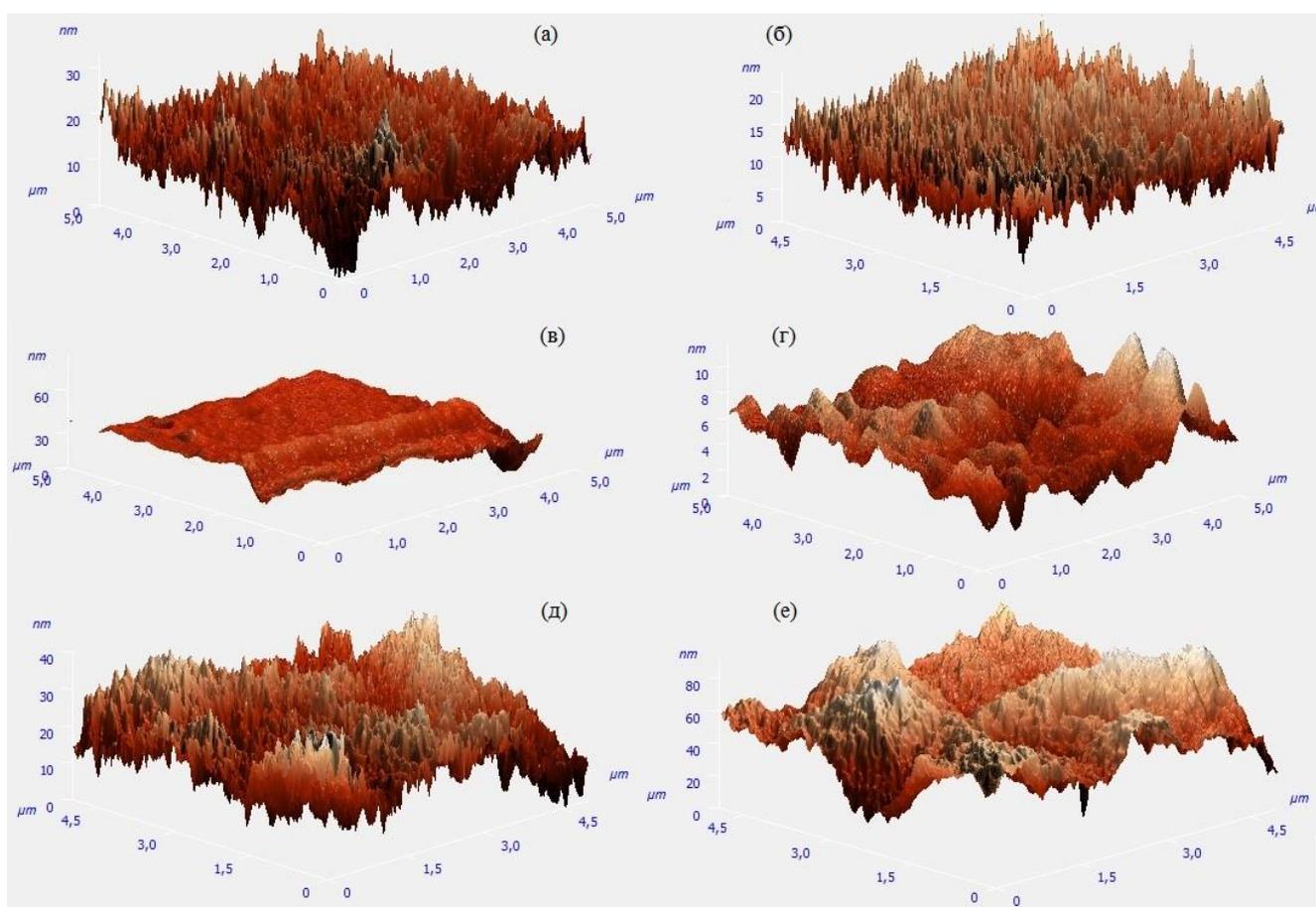


Рисунок 47. Топография поверхностей пленок хитозана, полученных из растворов:

- 1, 2** – pH = 4.8 (MM = 1.05×10^5); **2** - ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%;
3, 4 – pH = 3.3 (MM = 1.05×10^5); **4** - ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%;
5, 6 – pH = 4.8 (MM = 2.20×10^5); **6** - ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%

Введение НЧ серебра в композиты в случае конформации макромолекул хитозана – спираль сохраняет характер поверхности, а в случае клубка –

существенно изменяет, нарушая параллельную укладку структур и делая ее бугристой. Также прослеживается влияние ММ на структуру плено, как при сравнении исходных образцов, так и композитов с НЧ серебра. В случае более высокомолекулярного хитозана ($2,20 \times 10^5$), содержащего НЧ, игольчатые структуры формируют бугры, с перепадом по высоте в 80 нм против 40 нм в их отсутствие.

Заметно влияние НЧ серебра на температуру разложения композитов хитозана. При введении НЧ серебра в композит, термическая стабильность хитозана понижается (рисунок 48)

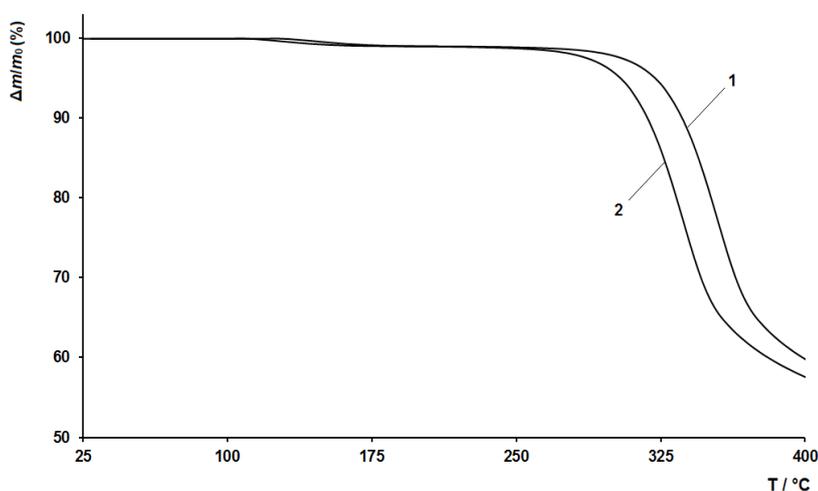


Рисунок 48. Кривые термогравиметрического анализа: (1) – хитозан; (2) – хитозан, содержащий 0,01 мас.% НЧ серебра

Изменение структуры пленок хитозана при стабилизации его макромолекулами НЧ серебра проявляется в их физико-механических свойствах. Пленки готовили из растворов и дисперсий с разными конформационными состояниями цепей полисахарида. На рисунке 49 приведены типичные деформационные кривые пленок нанокомпозитов.

На рисунке 49 и в таблице 18 приведены усредненные значения физико-механических свойств пленок по результатам 10 измерений. Пленки на основе солевой формы хитозана, 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 хитозана. Эластичность пленок остается практически неизменной.

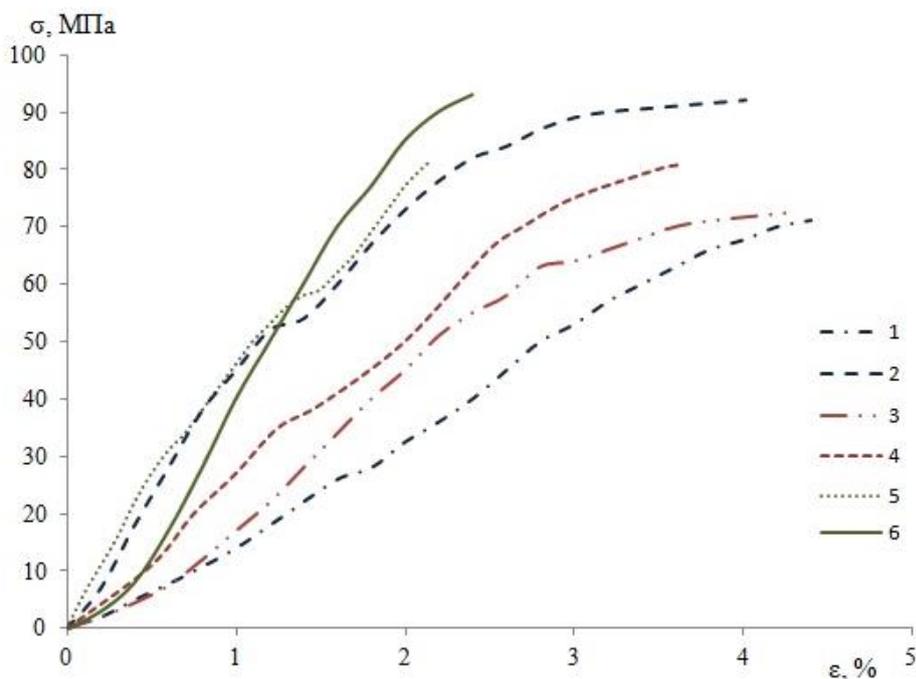


Рисунок 49. Деформационные кривые пленок хитозана, приготовленных из растворов (результаты соотносятся с данными в таблице 18):
1, 2 – pH = 4.8 (ММ = 1.05×10^5); **2** - ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%;
3, 4 – pH = 3.3 (ММ = 1.05×10^5); **4** - ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%;
5, 6 – pH = 4.8 (ММ = 2.20×10^5); **6** - ω (НЧ Ag) = 0,01 мас.%

Таблица 18. Физико-механические свойства композитов хитозана

| Образец | Напряжение на разрыв (σ), МПа | Деформация (ϵ), % |
|----------|--|------------------------------|
| 1 | 71,1 | 4,4 |
| 2 | 92,1 | 4,0 |
| 3 | 72,6 | 4,3 |
| 4 | 80,8 | 3,6 |
| 5 | 81,1 | 2,1 |
| 6 | 92,9 | 2,4 |

Заключение

Разработана кровоостанавливающая композиция на основе модифицированного хитозана, комплексно связанного с ионами кальция и НЧ серебра, с эффективным бактерицидным и ранозаживляющим действием в форме геля, губки и пленки.

Композиция прошла положительные доклинические испытания и защищена патентами:

1. Патент RU №2545991. «Кровоостанавливающий препарат». Оpubл. 10.04.2015; Бюл. № 10 - 6 с.
2. Патент евразийский № 026104. «Кровоостанавливающее и ранозаживляющее средство». Оpubл. 31.03.2017; Бюл. № 3 - 8 с.

Выводы

1. Показана применимость спектрального метода исследования для определения конформационного перехода клубок-спираль и спираль-глобула макромолекул хитозана в воднокислотных растворах. Конформационный переход спираль-клубок является рН- и термочувствительным и не зависит от ММ хитозана при одинаковой степени деацетилирования. Эффективные размеры макромолекул одних и тех же образцов хитозана 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 хитозан зависит от конформационного состояния его макромолекул. Указанные характеристики в случае конформации макромолекул хитозана - клубок превышают соответствующие характеристики для спиральной конформации при одинаковых условиях синтеза. Получены водорастворимые блок-сополимеры хитозан-ПВП с регулируемым размером блоков, биодegradация которых в организме не приводит к негативным последствиям.
3. На основе хитозана, 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 хитозана.
5. Выявлено взаимное влияние хитозана и НЧ серебра при их формировании в растворах полисахарида. Средние размерные характеристики макромолекул хитозана 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 хитозана и конформационного состояния его макромолекул.

6. НЧ серебра в концентрации < 0.2 мас.% значительно снижают температуры стеклования и деструкции композитов на основе хитозана и улучшают их прочность.

Список сокращений

НЧ – наночастицы

ГЭМА – 2-гидроксиэтилметакрилат

ВП – N-винилпирролидон

ПВП – поли-N-винилпирролидон

ХТЗ - хитозан

СД – степень деацетилирования

ММ – молекулярная масса

УЗ – ультразвук

ГПХ – гель-проникающая хроматография

РМУ - метод рассеяния рентгеновских лучей на малых углах

DLS – динамическое рассеяние света

ELS – метод электрофоретического рассеяния

РФА – рентгенофазовый анализ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ДСК – дифференциально-сканирующая калориметрия

ТГ – термогравиметрический анализ

ИК – инфракрасная спектроскопия

Список литературы

1. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications / M. Rinaudo // *Progress in Polymer Science*. - 2006. - V. 31. - № 7. - P. 603–632.
2. Быкова, В.М. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана: Хитин, его строение и свойства / В.М. Быкова, С.В. Немцев // *Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение*. – М.: Наука, 2002. – С. 7-23.
3. Ioelovich M. Crystallinity and Hydrophilicity of Chitin and Chitosan / M. Ioelovich // *Research and Reviews: Journal of Chemistry*. - 2014. - V. 3. - № 3. - P. 7-14.
4. Kozo, O. Three D structures of chitosan / O. Kozo, Y. Toshifumi, O. Kenji. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2004. – V. 34. - P. 1–8.
5. Тихонов, В.Е. Множественность понятия «хитозан» и терминология в области хитина и хитозана / В.Е. Тихонов; Под редакцией: К.Г. Скрябина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. – М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 2013. –С. 42-48.
6. Смотрина, Т. В. Тонкая структура и гидрофильные свойства термически модифицированных полисахаридов. 1. Сорбция воды термически модифицированными полисахаридами / Т. В. Смотрина, В. А. Смотрин, О. В. Стоянов. // *Вестник технологического университета*. -2015. - Т.18. - №16. - С. 18-21.
7. Маслова, Г.В. Влияние вида хитинсодержащего сырья на физико-химические свойства хитиновых биополимеров, полученных с помощью электрохимически активированных / Г.В. Маслова // *Сборник тезисов докладов участников Шестой Международной конференции «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана»*. – Москва. - 2001. - С. 35-38.
8. Muxika, A. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications / A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, K. de la Caba // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2017. - V. 105. - P. 1358-1368.
9. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина., Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. - М.: Наука, 2002. – 360 с.

10. Абдуллин, В.Ф. Технология и свойства хитозана из панциря речного рака / В.Ф. Абдуллин, С.Е. Артёменко, Г.П. Овчинникова // Вестник СГТУ. - 2006. – Т. 4. № 16. – С. 18-24.
11. Чермит, З. М. О применении препаратов хитозана в пищевой промышленности / З.М. Чермит, Н.М. Агеева // Плодоводство и виноградарство юга России. - 2016. - № 39 - С. 192-208.
12. Бойко, И. С. Вязкостная деградация кислотных растворов хитозана и её изучение методом ионного зонда / И.С. Бойко, О.А. Подколотная, С.Г. Лысачок, С.Л. Шмаков // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. - 2015. - Т. 15. - № 4. - С. 21-30.
13. Нудьга, Л. А. Молекулярные и надмолекулярные превращения в растворах хитозана и аллилхитозана / Л. А. Нудьга, В. А. Петрова, А. М. Бочек, О. В. Каллистов, С. Ф. Петрова, Г. А. Петропавловский // Высокомолек. соедин. - 1997. - Т. 39Б. - № 7. - С. 1232–1236.
14. Holme, H. K. Thermal Depolymerization of Chitosan Chloride / H. K. Holme, H. Foros, H. Pettersen, M. Dornish, O. Smidsrod // Carbohydrate Polymers. - 2001. - V. 46. - P. 287–294.
15. Morris, G. A. The Kinetics of Chitosan Depolymerisation at Different Temperatures / G. A. Morris, J. Castile, A. Smith, G. G. Adams, S. E. Harding // Polymer Degradation and Stability. - 2009. - V. 94. - P. 1344–1348.
16. Jun, H. K. Chitosan as a Coagulant for Recovery of Proteinaceous Solids from Tofu Wastewater / H. K. Jun, J. S. Kim, S. P. Meyers // J. Agric. Food Chem. - 1994. - V. 42. - № 8. - P. 1834–1838.
17. No, H. K. Stability and Antibacterial Activity of Chitosan Solutions Affected by Storage Temperature and Time / H. K. No, S. H. Kim, S. J. Lee, N. Y. Park, W. Prinyawiwatkul // Carbohydrate Polymers. - 2006. - V. 65. - P. 174–178.
18. Cho, Y. I. Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products / Y. I. Cho, H. K. No, S. P. Meyers // J. Agric. Food Chem. - 1998. - V. 46. - № 9. - P. 3839–3843.

19. Козырева, Е. В. Особенности физико-химических свойств растворов хитозана / Е. В. Козырева, А. Ю. Абрамов, А. Б. Шиповская // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. - 2011. - Т. 11. - № 2. - С. 25–31
20. Федосеева, Е.Н. Вязкостные свойства растворов хитозана и его реакционная способность / Е.Н. Федосеева, Л.А. Смирнова, В.Б. Федосеев // Вестник Нижегородск. ун-та им. Н.И. Лобачевского. - 2008. - № 4. - С. 59-64.
21. Хитозан: сб. ст. / Под ред. К.Г. Скрыбин и др. - М.: Центр "Биоинженерия", - 2013. - 591 с.
22. Quiñones, J. P. Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery / J. P. Quiñones, Hazel Peniche, C. Peniche // Polymers. - 2018. - V. 10. - № 3. - P. 235-268.
23. Wang, J. Mechanism of Surface Charge Triggered Intestinal Epithelial Tight Junction Opening Upon Chitosan Nanoparticles for Insulin Oral Delivery / J. Wang, M. Kong, Z. Zhou, D. Yan, X. Yu, X. Chen, C. Feng,; Y. Liu, X. Chen // Carbohydr. Polym. - 2017. - V. 157. P. 596–602.
24. Cánepa, C. Development of a Drug Delivery System Based on Chitosan Nanoparticles for Oral Administration of Interferon- α / Cánepa C, Imperiale J. C., Berini C. A., Lewicki M., Sosnik A., Biglione M. M. // Biomacromolecules. - 2017. - V. 18. - № 10. - P. 3302-3309.
25. Huang, G. Chitosan and its derivatives as vehicles for drug delivery / G. Huang, Y. Liu, L. Chen // Journal Drug Delivery. - 2017. - V. 24. – № 2. - P. 108-113.
26. Foda, N.H.; El-Iaithy, M.; Tadros, I. Implantable biodegradable sponges: Effect of interpolymer complex formation of chitosan with gelatin on the release behavior of tramadol hydrochloride // Drug Dev. Ind. Pharm. 2007. 33. PP. 7–17.
27. Dhanaraj, S.A.; Selvadurai, M.; Santhi, K.; Hui, A.L.S.; Wen, C.J.; Teng, H.C. Targeted drug delivery system: -formulation and evaluation of chitosan nanospheres containing doxorubicin hydrochloride // Int. J. Drug Deliv. 2014. 6. PP. 186–193.

28. Makhlof. A., Tozuka. Y., Takeuchi. H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2011. 42. PP. 445–451.
29. Chavana, C. Cross-linked chitosan-dextran sulphate vehicle system for controlled release of ciprofloxacin drug: An ophthalmic application / C. Chavana, P. Bala, K. Pal, S.N. Kale // *OpenNano.* - 2017. - V. 2. - P. 28-36.
30. Lin, H.-Y. Controlled release of pentoxifylline from porous chitosan-pectin scaffolds / H.-Y. Lin, C.-T. Yeh // *Drug Delivery.* - 2010. - V. 17. - P. 313-321.
31. Wu, T. Chitosan-based composite hydrogels for biomedical applications / T. Wu, Y. Li, D. S. Lee // *Macromolecular Research.* - 2017. - V. 25. - № 6. - P. 480–488.
32. Liu, H. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing / H. Liu, C. Wangab, C. Li, Y. Qina, Z. Wanga, J. Wang // *RSC Adv.* - 2018. - V. 8. - P. 7533-7549.
33. Murakami, K. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings / K. Murakami, H. Aoki, S. Nakamura, M. Takikawa, M. Hanzawa, S. Kishimoto, H. Hattori, Y. Tanaka, M. Ishihara // *Biomater.* - 2010. – V. 31. - P. 83–90.
34. Shen, E.C. Tetracycline release from tripoly phosphate-chitosan cross-linked sponge: a preliminary in vitro study / E. C. Shen, C. Wang, E. Fu, C. Y. Chiang, T. T. Chen, S. Nieh // *J. Periodontal Res.* - 2008. – V. 43. - P. 642–648.
35. Boddohi, S. Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan / S. Boddohi, N. Moore, P. A. Johnson, M. J. Kipper // *Biomacromolecules.* - 2009. – V. 10. - P. 1402–1409.
36. Il'ina A. V. Chitosan-based polyelectrolyte complexes: a review / A. V. Il'ina, V. P. Varlamov. // *Appl. Biochem. Microbiol.* - 2005. – V. 41. - P. 5–11.
37. Lian, Q. Fabrication and in vitro evaluation of calcium phosphate combined with chitosan fibers for scaffold structures / Q. Lian, D. Li, Z. Jin, J. Wang, A. Li, Z. Wang, Z. Jin // *J. Bioact. Compat. Polym.* - 2009. – V. 24. - P. 113–124.

38. Di Martino, A. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering / A. Di Martino, M. Sittinger, M.V. Risbud // *Biomaterials*. - 2005. – V. 26. - P. 5983–5990.
39. Hu, Q. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture / Q. Hu, B. Li, M. Wang, J. Shen // *Biomaterials*. - 2004. – V. 25. - P. 779–785.
40. Wu, Y. Chitosan/alginate multilayer scaffold encapsulating bone marrow stromal cells in situ on titanium / Y. Wu, N. Chen, L. K. Liu, H. Yuan, Q. L. Li, S. H. Chen. // *J. Bioact. Compat. Polym.* - 2009. - 24. - P. 301–315.
41. Chevrier A. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects / A. Chevrier, C. D. Hoemann, J. Sun, M. D. Buschmann // *Osteoarthr Cartil.* - 2007. – V. 15. - P. 316–327.
42. Ilbasimis-Tamer, S. Multiwalled Carbon nanotube-Chitosan Scaffold: Cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on chondrocyte cell lines / S. Ilbasimis-Tamer, H. Çiftçi, M. R. Tu, T. Degim, U. Tamer // *Curr Pharm Biotechnol.* - 2017. - V. 18. - № 4. - P. 327-335.
43. Ribeiro, J. C. V. Versatility of Chitosan-Based Biomaterials and Their Use as Scaffolds for Tissue Regeneration / J. C. V. Ribeiro, R. S. Vieira, I. M. Melo, V. M. A. Araújo, V. Lima // *The Scientific World Journal.* - 2017. - V. 2017. - P. 1-25.
44. Pogorielov, V. M. Chitosan as a Hemostatic Agent: Current State / Pogorielov V. M., V. Z. Sikora P. // *Article (PDF Available)*. - 2015. - P. 1-16.
45. Yang, Y. Bacterial inhibition potential of quaternised chitosan-coated VICRYL absorbable suture: An in vitro and in vivo study / Y. Yang, S.-B. Yang, Y.-G. Wang, S.-H. Zhang, Z.-F. Yu, T.-T. Tang // *Journal of Orthopaedic Translation.* – 2017. – V. 8. – P. 49–61.
46. Shakeel, A. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing / A. Shakeel, I. Saiqa // *Achievements in the Life Sciences.* - 2016. - V. 10. - № 1. - P. 27-37.

47. Cruz, R. C. Effect of different carboxylic acids as solvent on chitosan fibers production by wet spinning / R. C. Cruz, L. G. Diniz, H. M. Lisboa, M. V. Fook // *Materia*. – 2016. -V. 21. - №2. - P. 525-531.

48. Li, X.-Q. Crosslinked and Dyed Chitosan Fiber Presenting Enhanced Acid Resistance and Bioactivities / X.-Q. Li, R.-C. Tang. // *Polymers*. - 2016. – V. 8. – P. 119.

49. Ylitalo, R. Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan / Ylitalo R, Lehtinen S, Wuolijoki E, Ylitalo P, Lehtimäki T. // *Arzneimittelforschung*. - 2002. - V. 52. - № 1. - P. 1-7.

50. Tuma, J. Chitosan Derivatives as Bile Acid and Cholesterol Sorbents / J. Tuma, M. Marounek, D. Dušková, J. Copíková, A. Synytsya // *J. Chitin Chitosan*. - 2011. - V. 16. - № 4. - P. 262-270.

51. Patent US 8236781B2 Int. Cl. A6 IK3I/722, A6 IK 8/02. Hydrogel of chitosan carboxyalkylamide, preparation thereof and cosmetic and dermatological use thereof / E. Laugier, F. Gouchet, J.-P. Perraud. - Pub. Date: 15.06.2009.

52. Aranaz, I. Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives / I. Aranaz, N. Acosta, C. Civera, B. Elorza, J. Mingo, C. Castro, M. L. Gandía, A. H. Caballero // *Polymers*. - 2018. - V. 10. - № 2. - P. 213 73. US3953608 A

53. Васюкова, Н. И. Механизм действия хитозана при индуцировании устойчивости картофеля / Н. И. Васюкова, Я. С. Панина, Г. И. Челенко, Н. Г. Герасимова, С. М. Придворова, О. Л. Озерецковская // *Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы восьмой международной конференции*. – М.: Изд-во ВНИРО, 2006. – С. 321-323.

54. Байрамбеков, Ш. Б. Биостимулятор на основе низкомолекулярного хитозана из панциря раков для предпосевной обработки семян томатов / Ш. Б. Байрамбеков, Е. В. Полякова, М. Д. Мукатова, Н. А. Киричко // *Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство*. -2012. - №1. - С. 181 - 184.

55. Сафронова, Т. М. Применение хитозана в производстве пищевых продуктов / Т. М. Сафронова // Хитин и хитозан. Получение, свойства, применение. – М.: Наука, 2002. – С. 346-359.

56. Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities // Edited by: Silvia Bautista-Banos, Gianfranco Romanazzi and Antoinio Jiménez-Aparicio: - Academic Press. - 2016. - 384 p.

57. Топурия, Г. М. Ветеринарно-санитарная оценка продуктов убоя утят при применении хитозана / Г. М. Топурия, Л. Ю. Топурия, В. П. Корелин, М. Б. Ребезов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2014. - № 3. - С. 95-97.

58. Юдаков, А. А. Особенности применения флокулянтов и сорбентов для очистки технологической воды и производственных стоков / А. А. Юдаков, Д. В. Червонецкий, Перфильев А.В. // Горный информационно-аналитический бюллетень. - 2014. - № 4. - С. 126-135.

59. Быкова, В. М. Некоторые аспекты использования хитина и хитозана в качестве флокулянтов / В. М. Быкова, Е. А. Ежова, С. В. Немцев // Аграрная Россия. - 2004. - №5. - С. 30-31.

60. Patent US3903268A. Int. Cl. A61K 27/00. Chitin and chitin derivatives for promoting wound healing / L. L. Balassa – Pub. date: 19.02.1971.

61. Chen, C.L. The effect of water-soluble chitosan on macrophage activation and the attenuation of mite allergen-induced airway inflammation / C. L. Chen, Y. M. Wang, C. F. Liu, J. Y. Wang // Biomaterials. – 2008. - V. 29. – P. 2173-2182.

62. Dash, M. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications / M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, E. Chiellini // Prog. Polym. Sci. – 2011. – V. 36. - P. 981–1014.

63. Zhang, H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation / H. Zhang, S.H. Neau // Biomaterials.- 2011. - V. 22. P. 1653–1658.

64. Bhavsar, C. Functionalized and graft copolymers of chitosan and its pharmaceutical applications / C. Bhavsar, M. Momin, S. Gharat, A. Omri // *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2017. - V. 14. - № 10. - P. 1189-1204.

65. Андриянова, Н.А. Модификация хитозана акрилонитрилом - блок- и привитая сополимеризация, полимераналогичные превращения: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.06 / Андриянова Наталья Александровна. – Нижний Новгород., 2005. – 108 с.

66. Нудьга, Л. А. Структурно-химическая модификация хитина, хитозана и хитин-глюкановых комплексов: дис. ... докт. хим. наук: 02.00.06 / Нудьга Людмила Александровна. - Санкт-Петербург, 2006. - 361 с.

67. Hadjichristidis, N. Graft copolymers / N. Hadjichristidis, S.Pispas, M. Pitsikalis, H. Iatrou, D. J. Lohse // *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*: Wiley. - 2002.

68. Banerjee, S. Surface confined atom transfer radical polymerization: access to custom library of polymer-based hybrid materials for speciality applications / S. Banerjee, T. K. Paira, T. K. Mandal // *Polym. Chem.* - 2014. - № 5. - P. 4153-4167.

69. Aziz, N. A. A. Synthesis of chitosan-grafted-poly(methyl methacrylate) with Fenton's Reagent (Fe^{2+} - H_2O_2) as a redox initiator / N. A. A. Aziz, A. A. Bakar, A. Hassan, N. Azmi // *The Malaysian Journal of Analytical Sciences.* - 2014. - V. 18. - № 2. -P. 415 – 422.

70. Prashanth, K. Studies on graft copolymerization of chitosan with synthetic monomers / K. Prashanth, R. Tharanathan // *Carbohydrate Polymers.* - 2003. – V. 54 – № 3. – P. 343-351.

71. Yazdani-Pedram, M. Homogeneous grafting reaction of vinyl pyrrolidone onto chitosan / M. Yazdani-Pedram, J. Retuert // *J. Appl. Polym. Sci.* - 1997. – V. 63. - P. 1321-1326.

72. Najjar, A. M. K. Preparation and characterization of poly(2-acrylamido-2-methylpropane-sulfonic acid) grafted chitosan using potassium persulfate as redox initiator / A. M. K. Najjar, W. W. Yunus, M. B. Ahmad, M. Z. A. Rahman // *Applied Polymer.* - 2000. - V. 77. - № 10. – P. 2314–2318.

73. Pourjavadi, A. Modified chitosan. I. Optimized cerium ammonium nitrate-induced synthesis of chitosan-g-polyacrylonitrile / A. Pourjavadi, G.R. Mahdavinia, M.J. Zohuriaan-Mehr, H. Omidian // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2003. - V. 88. - P. 2048-2054.

74. Kim, S.Y. Thermo- and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide / S.Y. Kim, S.M. Cho, Y.M. Lee, S.J. Kim // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2000. – V. 78. – P. 1381-1391.

75. Don, T.-M. Preparation of chitosan-graft-poly(vinyl acetate) copolymers and their adsorption of copper ion / T.-M. Don, C.-F. King, W.-Y. Chiu // *Polym. J.* – 2002. - V. 34. - P. 418-425.

76. Caner, H. Graft copolymerization of 4-vinylpyridine on to chitosan. 1. By ceric ion initiation / H. Caner, H. Hasipoglu, O. Yilmaz, E. Yilmaz // *Eur. Polym. J.* - 1998. – V. 34. - P. 493-497.

77. Zhang, J. Synthesis and characterization of chitosan grafted poly(N,N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl) ammonium) initiated by ceric (IV) ion / J. Zhang, Y. Yuan, J. Shen, S. Lin // *Eur. Polym. J.* – 2003. – V. 39. P. 847-850.

78. Sun, Y. UV-Initiated Graft Copolymerization of Cationic Chitosan-Based Flocculants for Treatment of Zinc phosphate-Contaminated Wastewater / Y. Sun, M. Ren, C. Zhu // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2016. – V. 55. - № 38. - P.10025–10035.

79. Franca, E. F. Characterization of Chitin and Chitosan Molecular Structure in Aqueous Solution / E. F. Franca, R. D. Lins, L. C. G. Freitas, T. P. Straatsma // *J. Chem. Theory Comput.* – 2008. - V. 4. - № 12. - P. 2141–2149.

80. Morris, G. A. Macromolecular conformation of chitosan in dilute solution: A new global hydrodynamic approach / G. A. Morris, J. Castile, A. Smith, G. G. Adams, S. E. Harding // *Carbohydrate Polymers.* - 2009. - V. 76 - P. 616–621.

81. Сливкин, А. И. Изучение свойств растворов хитозана / А. И. Сливкин, А. С. Беленова, Г. В. Шаталов, В. А. Кузнецов, Д. А. Сливкин, Л. И. Фирсова // *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация.* - 2014. - № 1. - С. 134-137.

82. Costa, C. N. Viscometric study of chitosan solutions in acetic acid/sodium acetate and acetic acid/sodium chloride / C. N. Costa, V. G. Teixeira, M. C. Delpech, J. V. S. Souza, M. A. S. Costa // Carbohydrate Polymers. - 2015. - V. 133. - P. 245-250.

83. Desbrieres, J. Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution / J. Desbrieres, J. Brugnerotto, L. Heux, M. Rinaudo // Macromolecular Symposia. - 2001. - V. 168. - №1. P. 1 - 20.

84. Faccia1, P. A. Evaluation of pH-sensitive poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate) copolymers as drug delivery systems for potential applications in o phthalmic therapies/ocular delivery of drugs / P. A. Faccia1, F. M. Pardini, J. I. Amalvy // Express Polymer Letters. – 2015. - V. 9. - № 6. - P. 554–566.

85. Ma, Y. Investigation of suspension polymerization of hydrogel beads for drug delivery / Y. Ma, P. Lee. // Iran Polym. J. – 2009. – V. 18. – № 4. – P. 307 –313.

86. Horak, D. Hydrogel in endovascular embolization. Chemical reaction in liquid and solid phase / D. Horak, K. Z. Gumargalieva, G. E. Zaikov // N.Y.: Nova Science Publishers. - 2003. - P. 11–59.

87. Design of Antibiotic Drug Loaded CarbopolCrosslinked-Poly(2-Hydroxyethylmethacrylate) Hydrogel for Wound Dressing Applications / B. Singh, A. Sharma, A. Sharma, A. Dhiman // American Journal of Drug Delivery and Therapeutics. - 2017. - V. 4 - P. 1-9.

88. Dong, W. Development of a new type of biodressing for burns, human hair keratin-collagen sponge-complex / W. Dong // The Faseb Journal. - 2008. – V. 22. - P. 1432 – 1437.

89. Mun, G. A. Studies on graft copolymerization of 2-hydroxyethyl acrylate onto chitosan / G. A. Mun, Z. S. Nurkeeva, S. A. Dergunov, I. K. Nam, T. P. Maimakov, E. M. Shaikhutdinov, S. C. Lee, K. Park // Reactive & Functional Polymers 68 (2008) 389–395

90. El-Tahlawy, K. Graft copolymerization of hydroxyethyl methacrylate onto chitosan / K. El-Tahlawy, S. Hudson // Journal of Applied Polymer Science. -2001. - V. 82. - № 3. - P. 683-702.

91. Joshi, J. M. Graft copolymerization of 2-hydroxyethylmethacrylate onto carboxymethyl chitosan using CAN as an initiator / J. M. Joshi, V. Kumar Sinha // *Polymer*. - 2006. - V. 7. - № 6. - P. 2198–2204.
92. Casimiroa, M. H. Study on chemical, UV and gamma radiation-induced grafting of 2-hydroxyethyl methacrylate onto chitosan / M. H. Casimiro, M. L. Botelho, J. P. Leal, M. H. Gil // *Radiation Physics and Chemistry*. - 2005. - V. 72. - № 6. - P. 731–735.
93. Zohuriaan-Mehr M. J. Advances in chitin and chitosan modification through graft copolymerization: a comprehensive review / M. J. Zohuriaan-Mehr // *Iran. Polym. J.* - 2005. - V. 14. - № 3. - P. 235-265.
94. Jenkins D. W. Review of Vinyl Graft Copolymerization Featuring Recent Advances toward Controlled Radical-Based Reactions and Illustrated with Chitin/Chitosan Trunk Polymers / D. W. Jenkins, S. M. Hudson // *Chem. Rev.* – 2001. V. 101. - № 11. - P.3245–3274.
95. Yilmaz, E. Grafting of poly(triethylene glycol dimethacrylate) onto chitosan by ceric ion initiation / E. Yilmaz, T. Adali, O. Yilmaz // *Reactive and Functional Polymers*. - 2007. - V.67. - № 1. - P. 10.
96. Metzler, M. Preparation and characteristics of nanosilver composite based on chitosan-graft-acrylic acid copolymer / M. Metzler, M. Chylińska, H. Kaczmarek // *Journal of Polymer Research*. - 2015. - V. 22. - P. 146.
97. Teodorescu, M. Poly(vinylpyrrolidone) – A Versatile Polymer for Biomedical and Beyond Medical Applications / M. Teodorescu, M. Bercea // *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. - 2015. - V. 54. - № 9. - P. 923-943.
98. Feng, H. Block Copolymers: Synthesis, Self-Assembly, and Applications / H. Feng, X. Lu, W. Wang, N.-G. Kang, J. W. Mays // *Polymers*. - 2017. - V. 9. - P. 494 - 527.
99. Sutirman, Z. A. New crosslinked-chitosan graft poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) for the removal of Cu(II) ions from aqueous solutions / Z. A. Sutirman, M. M. Sanagi, J. A. Karim, A. A. Naim, W. A. Wan Ibrahim // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2018. - V. 107. - P. 891-897.

100. Reddy, C. L. N. Development and Characterization of Chitosan-Poly (Vinyl Pyrrolidone) Blend Microspheres for Controlled Release of Metformin Hydrochloride / C. L. N. Reddy, B. Y. Swamy, C. V. Prasad, K. M. Rao, M. N. Prabhakar, C. Aswini // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. - 2012. - V. 61. - № 6. - P. 424-436.
101. Barros J. A. G. Hydrogels from Chitosan and a Novel Copolymer Poly(N-Vinyl-2-Pyrrolidone-Co-Acrolein) / J. A. G. Barros, , A. J. C. Brant, L. H. Catalani // Materials Sciences and Application. - 2011. - V. 2. - P. 1058-1069.
102. Matcham S. Fluorescence Imaging in Genipin Crosslinked Chitosan–Poly(vinyl pyrrolidone) Hydrogels / S. Matcham, K. Novakovic // Polymers. - 2016. - V. 8. - № 11. - P. 385.
103. Klevens, R. M. Invasive Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections in the United States / R. M. Klevens, M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, // JAMA. – 2007. – V. 298. - P. 1763–1771.
104. Vrček, I. V. Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells / I. V. Vrček, I. Žuntar, R. Petlevski, I. Pavičić, M. Sikirić, M. Ćurlin, W. Goessler // Environ Toxicol. - 2016. - V. 31. - № 6. - P.679-692.
105. Choi, Y. Comparative toxicity of silver nanoparticles and silver ions to Escherichia coli / Y. Choi, H. Kim, K.-W. Kim, B.-T. Lee // Journal of Environmental Sciences. - 2018. - V. 66. - P. 50-60.
106. Kedziora, A. Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents / A. Kedziora, M. Speruda, E. Krzyzewska, J. Rybka, A. Lukowiak, G. Bugla-Ploskonska // Int. J. Mol. Sci. - 2018. - V. 19. - P. 1-17.
107. Chudobova, D. The effect of silver ions and silver nanoparticles on Staphylococcus aureus / D. Chudobova, D. Maskova, L. Nejdil, P. Kopel, V. Adam, R. Kizek // Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. - 2013. - P. 728–735.

108. Rai, M. K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria / M. K. Rai, S. D. Deshmukh, A. P. Ingle, A. K. Gade // *J. Appl. Microbiol.* - 2012. - V. 112. - № 5. - P. 841-52
109. Wilkinson, L. J. Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: a review of efficacy and safety / L. J. Wilkinson, R. J. White, J. K. Chipman // *J. Wound Care.* – 2011. - V. 20. № 11. - P. 543-549.
110. Corrêa, J. M. Silver Nanoparticles in Dental Biomaterials / J. M. Corrêa, M. Mori, H. L. Sanches // *International Journal of Biomaterials.* – 2015. – V. 2015. - 9 p.
111. De Giglio, E. An innovative, easily fabricated, silver nanoparticle-based titanium implant coating: development and analytical characterization / E. De Giglio, D. Cafagna, S. Cometa // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2013. - V. 405. - P. 805-16
112. Carbone, M. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging / M. Carbone, D. T. Donia, G. Sabbatella, R. Antiochia // *Journal of King Saud University - Science.* - 2016. - V. 28. - № 4. - P. 273-279.
113. Dos Santos, C.A. Silver nanoparticles: Therapeutical uses, toxicity, and safety issues / C.A. Dos Santos, M.M. Seckler, A.P. Ingle, I. Gupta, S. Galdiero, M. Galdiero, A. Gade, M. Rai // *J. Pharm. Sci.* - 2014. – V. 103. – P. 1931–1944.
114. Rai, M. Metalnanoparticles: The protective nanoshield against virus infection / M. Rai, S.D. Deshmukh, A.P. Ingle, I.R. Gupta, M. Galdiero, S. Galdiero, // *Crit. Rev. Microbiol.* - 2014. - P. 1–11.
115. Mijndonckx, K. Antimicrobial silver: Uses, toxicity and potential for resistance / K. Mijndonckx, N. Leys, J. Mahillon, S. Silver, R. Van Houdt // *Biometals.* – 2013. - V. 26. – P. 609–621.
116. Chernousova, S. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal / S. Chernousova, M. Epple // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2013. - V. 52. – P. 1636–1653.
117. Shahverdy, A. R. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus* and *Escherichia coli* / A. R. Shahverdy, A. Fakhimi, S. Minaian // *Nanomedicine-Nanotechnology biology and medicine.* 2007. - V. 3. - P. 168-171.

118. Honary, S. Preparation, Characterization and Antibacterial Properties of Silver-Chitosan Nanocomposites Using Different Molecular Weight Grades of Chitosan / S. Honary, K. Ghajar, P. Khazaeli // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* February. – 2011. – V. 10. - № 1. - P. 69-74.

119. Ahmad, M. B. Synthesis of Silver Nanoparticles in Chitosan, Gelatin and Chitosan/Gelatin Bionanocomposites by a Chemical Reducing Agent and Their Characterization / M. B. Ahmad, J. J. Lim, K. Shamel // *Molecules*. – 2011. - V. 16. – P. 7237-7248.

120. Darroudi, M. Effect of Accelerator in Green Synthesis of Silver Nanoparticles / M. Darroudi, M. B. Ahmad, A. H. Abdullah // *Int. J. Mol. Sci.* – 2010. - V. 11. – P. 3898-3905

121. Velazquez-Velazquez, J.L. Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles / J.L. Velazquez-Velazquez, A. Santos-Flores, J. Araujo-Melendez, R. Sanchez-Sanchez, C. Velasquillo, C. Gonzalez, G. Martinez-Castanon, F. Martinez-Gutierrez // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* – 2015. - V. 49. – P. 604–611.

122. Sacco, P. Silver-containing antimicrobial membrane based on chitosan-TPP hydrogel for the treatment of wounds / P. Sacco, A. Travan, M. Borgogna, S. Paoletti, E. Marsich // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2015. - V. 26. - №3. – P. 128.

123. Roe, D. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles / D. Roe, B. Karandikar, J. B. Roullet // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2008. – V. 61. – P. 869–876.

124. Marassi, V. Silver nanoparticles as a medical device in healthcare settings: a five-step approach for candidate screening of coating agents / V. Marassi, L. Di Cristo, S/ G. J. Smith, S. Ortelli, Y. Volkov, A. Prina-Mello // *R. Soc. Open. Sci.* - 2018. - V. 5. - P. 1-21.

125. Stevens, K. N. Hydrophilic surface coatings with embedded biocidal silver nanoparticles and sodium heparin for central venous catheters / K. N. Stevens, S. Croes, R. S. Boersma, E. E. Stobberingh, M. L. Knetsch, L. H. Koole // *Biomaterials*. - 2011. - V. 32. - P. 1264–1269.

126. Pal, S. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli* / S. Pal, Y. K. Tak, J. M. Song // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73. - P. 1712–1720.

127. Помогайло, А. Д. Наночастицы металлов в полимерах / А. Д. Помогайло, А. С. Розенберг, И. Е. Уфлянд – М.: Химия, 2000. – 671 с.

128. Зимон А. Д. Синтез и физико-химические свойства НЧ серебра, стабилизированных желатином / А. Д. Зимон, А. В. Вегера // *Известия Томского политехнического университета.* - 2006. - Т. 309. - № 5. – С. 60-64.

129. Богданчикова, Н. Е. Коллоидное серебро. Физико-химические свойства и применение / Н. Е. Богданчикова, В. И. Зайковский, В. Н. Коломийчук // *Препринт.* – Новосибирск. - 1992. – С. 15–30.

130. Богатырев, В.А. Методы синтеза наночастиц с плазменным резонансом. Пособие / В. А. Богатырев, Л. А. Дыкман, Н. Г. Хлебцов // Саратов: изд-во Саратовского гос. ун-та. – 2009. – 35 с.

131. Fuentes, S. Hybrid Chitosan-Mercaptopropyltrimethoxysilane Films with Ag and Au Nanoparticles: Synthesis and Properties / S. Fuentes, V. Vera, F. Rivera // *Molecular Crystals and Liquid Crystals.* – 2012. - V. 562. - P. 229–241.

132. Ramajo L. Preparation of amine coated silver nanoparticles using triethylenetetramine / L. Ramajo, R. Parra, M. Reboredo, M. Castro // *Journal of Chemical Sciences.* - 2009. - V. 121. - № 1. - P. 83-87.

133. Tajdidzadeh, M. Research Article Synthesis of Silver Nanoparticles Dispersed in Various Aqueous Media Using Laser Ablation / M. Tajdidzadeh, B. Z. Azmi, W. Mahmood M. Yunus, Z. Abidin Talib, A. R. Sadrolhosseini, K. Karimzadeh, S. A. Gene, M. Dorraj // *The Scientific World Journal.* – 2014. - V. 2014. - 7 p.

134. Humatova, S. F. Chitosan polymer composite material containing of silver nanoparticle / S. F. Humatova, N. A. Zeinalov, D. B. Taghiyev, S. Z. Tapdiqov, S. M. Mammedova. // *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.* - 2016. - V. 11. - №. 1. - P. 39 - 44

135. Борен, К. Поглощение и рассеяние света малыми частицами / Борен К., Хафмен Д. – М.: Мир, 1986. – 456 с.
136. Хлебцов, Н.Г. Золотые наноструктуры с плазмонным резонансом для биомедицинских исследований / Н. Г. Хлебцов, В. А. Богатырев, Л. А. Дыкман, Б. Н. Хлебцов // Российские нанотехнологии. - 2007. - Т. 2. - № 3-4. - С. 69.
137. Huang, L. UV-induced synthesis, characterization and formation mechanism of silver nanoparticles in alkaline carboxymethylated chitosan solution / L. Huang, M. L. Zhai, D. W. Long // Journal of Nanoparticle Research. - 2008. - V. 10. - № 7. - P. 1193.
138. Шатенштейн А. И. Практическое руководство по определению молекулярного веса и молекулярно-веса распределения полимеров. / Ю. П. Выровский, Н. А. Правикова, П. П. Алиханов, К. И. Жданова, А. Л. Изюмников // Под ред. Ю. В. Левинский. - М.: изд-во "Химия", 1964. – 188 с.
139. Практикум по биохимии: Учеб. пособие / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. - М: Изд-во МГУ, 1989. - 509 с.
140. Doyle, W.T. Optical extinction of metal spheres / W.T. Doyle, A. Agarwal // J. Opt. Soc. Am. – 1965. – V. 55. – P. 305–308.
141. Хлебцов, Н.Г. Новый спектральный резонанс металлических наностержней / Н. Г. Хлебцов, Л. А. Трачук, А. Г. Мельников // Опт. Спектр. – 2004. – Т. 97. – С. 105.
142. Воюцкий, С.С. Курс коллоидной химии / С.С. Воюцкий. – М.: Химия, 1975. – С.169-219.
143. Геллер, Б.Э. Практическое руководство по физикохимии волокнообразующих полимеров / Б. Э. Геллер, А. А. Геллер, В. Г. Чиртулов // Учебное пособие для вузов. 2-е изд., испр. и доп. - М.: Химия, 1996. - 432 стр.
144. Виноградов, Г.В. Реология полимеров / Г.В. Виноградов, А.Я. Малкин. – М.: Химия, 1977. - 440 с.
145. Kasaai, M. R. Fragmentation of Chitosan by Acids / M. R. Kasaai, J. Arul, G. Charlet // The Scientific World Journal. - V. 2013. - 11 p.
146. Степнова, Е. А. Получение производных высоко- и низкомолекулярного хитозана: физико-химические свойства и биологическая

активность: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.06 / Степнова Евгения Александровна. - Москва, 2009. - 143 с.

147. Нарисава, И. Прочность полимерных материалов: пер. с яп. / И. Нарисава. - М.: Химия, 1987. - 360 с.

148. Волкова, С.А. Основы клинической гематологии: учебное пособие / С. А. Волкова, Н. Н. Боровков. — Н. Новгород: Издательство Нижегородской гос. медицинской академии, 2013. - С. 42-55.

149. Физиология человека / Под ред. В. М. Покровского, Г. Ф. Коротько - М.: Медицина, 1997. – Т 1. - 448 с.

150. Zubareva, A. Characterization of protein and peptide binding to nanogels formed by differently charged chitosan derivatives / A. Zubareva, A. Ilyina, A. Prokhorov // *Molecules*. - 2013. - V. 18. - P. 7848-7864.

151. Chen, L. Chitosan/b-lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers / L. Chen, M. Subirade // *Biomaterials*. - 2005. - V. 26. - P. 6041–6053

152. Дятлова, Н.М. Комплексоны и комплексонаты металлов / Н.М. Дятлова, В.Я. Темкина, К.И. Попов. - М.: Химия, 1988. - 544 с.

153. Mirzaei, E. B. Studies on Glutaraldehyde Crosslinked Chitosan Hydrogel Properties for Drug Delivery Systems / E. B. Mirzaei, A. S. A. Ramazani, M. Shafiee, M. Danaei // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. - 2013. - V. 62. - № 11. - P. 605-611.

154. Патент евразийский 017871. Инд. кл. А61К 38/42 С07К 14/805. Кровезаменитель с функцией переноса кислорода, фармацевтическая композиция / А. Я. Гончарова, В. К. Подгородниченко, Р. А. Розиев, В. В. Хомиченок, А. Ф. Цыб, О. Б. Брускова. Дата публ.: 29.03.2013.

155. Черкасова, Е. И. Изучение хитозанолитической активности папаина с целью получения олигомеров и низкомолекулярного хитозана: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04, 03.00.12 / Черкасова Елена Игоревна. - Нижний Новгород, 2005. - 124 с.

156. Куранов, А. А. Разработка и экспериментально-клиническое обоснование применения пенополиуретановой повязки "Сарэл" в хирургии: дис.

... докт. мед. наук: 14.00.27 / Куранов Анатолий Александрович. - Нижний Новгород, 2005. - 231 с.

157. Воюцкий, С. С. Физико-химические основы пропитывания и импрегнирования волокнистых систем водными дисперсиями полимеров / С. С. Воюцкий. - Ленинград: Химия, 1969. — 336 с.

158. Khalil, K.A. Preparation and characterization of electrospun PLGA/silver composite nanofibers for biomedical applications / K.A. Khalil, H. Fouad, T. Elsarnagawy, F.N. Almajhdi. // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2013. - V. 8 - P. 3483–3493.

159. Ahmed, S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise / S. Ahmed, M. Ahmad, B. L. Swami, S. Ikram // *Journal of Advanced Research.* – 2016. - V. 7. - № 1. – 2016. - P. 17–28.

160. Yoksan, R. Silver nanoparticles dispersing in chitosan solution: Preparation by γ -ray irradiation and their antimicrobial activities / R. Yoksan, S. Chirachanchai // *Materials Chemistry and Physics.*- 2009. - V. 115. - №1. - P. 296.

161. Крутяков, Ю.А. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы / Ю.А. Крутяков, А.А. Кудринский, А.Ю. Оленин, Г.В. Лисичкин // *Успехи химии.* - 2008. - Т. 77. - № 3. - С. 242.

162. Amendola, V. Free Silver Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation in Organic Solvents and Their Easy Functionalization / V. Amendola, S. Polizzi, M. Meneghetti // *Langmuir.* - 2007. - Т. 67. - № 12. - P. 6765.

163. Angshuman, P. Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using ethanol as a reducing agent / P. Angshuman, S. Sunil, D. Surekha // *Materials Chemistry and Physics.* - 2009. - V.114. - № 2–3. - P. 530.

164. Mănoiu, V.S. Obtaining silver nanoparticles by sonochemical methods / V.S. Mănoiu, A. Aloman // *U.P.B. Sci. Bull. Ser. B.* - 2010. - V. 72. - № 2. - P. 179.

165. Saifuddin, N. Chitosan-silver Nanoparticles Composite as Point-of-use Drinking Water Filtration System for Household to Remove Pesticides in Water / N. Saifuddin, C.Y. Nian, L.W. Zhan and K.X. Ning // *Asian Journal of Biochemistry.* - 2011. - V. 6. - № 2. - P. 142-159.

166. 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.

167. Rai, M. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: The emerging trends and future prospects / M. Rai, K. Kon, A. Ingle, N. Duran, S. Galdiero, M. Galdiero // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2014. - V. 98. - P. 1951–1961.

168. Wu, D. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm / D. Wu, W. Fan, A. Kishen, J. L. Gutmann, B. Fan // *J. Endod.* - 2014. –V. 40. - P. 285–290.

169. Tamayo, L.A. Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and the penetration into *Listeria monocytogenes* / L. A. Tamayo, P. A. Zapata, N. D. Vejar, X. Zhou, G.E. Thompson, F. M. Rabagliati, M.A. Paez // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* - 2014. – V. 40. - P. 24–31.

170. Morones, J.R. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J.R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez, M. J. Yacaman // *Nanotechnology.* - 2005. – V. 16. – P. 2346–2353.

171. Hashimoto, M.C. Antimicrobial photodynamic therapy on drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-induced infection. An in vivo study / M. C. Hashimoto, R. A. Prates, I. T. Kato, S. C. Nunez, L. C. Courrol, M. S. Ribeiro, // *Photochem. Photobiol.* – 2012. - V. 88. - P. 590–595.

172. Franci G. Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents / G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelliand, M. Galdiero. // *Molecules.* – 2015. – V. 20. – P. 8856-8874.