

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра полимеров на базе ООО «АКРИПОЛЬ»

**Получения и свойства микротрубок хитозана**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ


Студентки 2 курса 251 группы  
направления 04.04.01 – «Химия»

Института химии

Бабичевой Татьяны Сергеевны

Научный руководитель


зав. кафедрой, доцент, д.х.н.

  
20.06.2016

Шиповская А.Б.

Заведующий кафедрой

зав. кафедрой, доцент, д.х.н.

  
20.06.2016

Шиповская А.Б.

Саратов 2016

## Введение

**Актуальность работы.** Хитозан (ХТЗ) – продукт частичного или полного деацетилирования хитина. Благодаря комплексу ценных в практическом отношении свойств, а также ежегодно возобновляемой сырьевой базе применяется в самых разнообразных областях жизни человека. Одним из актуальных направлений применения материалов на основе ХТЗ является получение биоразлагаемых протезов, стентов и графтов при лечении сердечно – сосудистых заболеваний. Применение протезов из биodeградируемых полимеров также позволит избежать повторного ремоделирования сосуда и особенно необходимо в случаях протезирования детей, организм которых претерпевает физиологическое взросление. Подобные протезы получают из биodeградируемых синтетических и природных полимеров [1-2]. Однако методы, используемые при получении таких материалов, являются многостадийными и зачастую предполагают использование агрессивных растворителей.

Перспективным для создания бидеградируемых материалов является аминополисахарид – ХТЗ. Поскольку температура термического разложения ХТЗ ниже температуры его плавления, переработка данного полимера в готовые изделия всегда включает стадию растворения в органических кислотах.

В связи с этим актуальной задачей является поиск новых подходов для получения из растворов ХТЗ полых цилиндрических каркасных структур (микротрубок) с заданными параметрами.

**Цель работы** – поиск новых подходов для получения микротрубок с заданными свойствами из растворов ХТЗ в гликолевой кислоте (ГК).

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

– определить гидродинамические и реологические параметры растворов ХТЗ в ГК без и с добавлением полиэтиленоксида (ПЭО) для определения оптимальных характеристик формовочных растворов;

- разработать способ получения микротрубок межфазной реакцией полимераналогичного превращения с использованием высаливателей разной химической природы;
- оценить морфологию поверхности стенки микротрубок ХТЗ;
- изучить упруго – пластические и физико-механические свойства полученных образцов микротрубок;
- исследовать биорезорбцию наиболее перспективных образцов в ферментативной модельной среде.

**Научная новизна.** В работе впервые:

- изучены гидродинамические и реологические свойства растворов ХТЗ в ГК без (с) добавлением ПЭО; определена концентрация формирования флуктуационной сетки зацеплений;
- разработан подход к получению бесшовных полых цилиндрических структур (микротрубок) на основе ХТЗ межфазной реакцией полимераналогичного превращения полисоль→полиоснование;
- установлено влияние химической природы высаливателя и добавки ПЭО на структуру и морфологию стенки образцов;
- изучена *in vitro* биodeградация микротрубок в ферментативной среде лизоцима, высказано предположение, что убыль массы обусловлена разрывом  $\beta$ -(1-4)-гликозидной связи.

**Практическая значимость работы.**

Полученные реологические характеристики носят справочный характер и представляют интерес для решения практических задач в различных областях полимерного материаловедения, в частности, при выборе концентрации ХТЗ в растворе ГК для получения полимерных материалов.

Разработанная методика получения бесшовных полых цилиндрических структур из растворов ХТЗ в ГК может быть перенесена на другие полисахаридсодержащие системы.

Полученные в работе результаты позволяют рассматривать микротрубки ХТЗ в качестве перспективных аналогов биodeградируемых протезов кровеносных сосудов и графтов.

Основная часть работы выполнена при поддержке грантов:

– Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, программа «УМНИК», проект «Разработка способа получения микротрубок ХТЗ – аналогов кровеносных сосудов», 2014 – 2016 г.г;

– Российского Фонда фундаментальных исследований, проект № 16-33-00953 «Научные основы получения биodeградируемых 3D структур из природных полисахаридов для создания аналогов кровеносных сосудов», 2016 г.

**Объем и структура магистерской диссертации.** Диссертация состоит из введения, 5 глав (1 глава – обзор литературы, 2 глава – объекты и методы исследования, 3 глава – получение и свойства микротрубок хитозана, 4 – получение и свойства микротрубок хитозана с добавкой полиэтиленоксида, 5 – ферментативная биodeградация микротрубок хитозана), заключения, выводов, техники безопасности и списка литературы.

Работа изложена на 78 стр., включает 45 рисунков и 8 таблиц, список литературы из 57 источников.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Проведенный литературный обзор показал, что на основе ХТЗ получают широкий спектр материалов медицинского назначения. Широкое применение получили пленки и волокна ХТЗ при изготовлении повязок для лечения ожогов кожи. Известно о получении микро и нанотрубок ХТЗ, которые перспективны к применению в качестве стентов для регенерации поврежденных нервов и т.п. [3]. Такие изделия, как правило, получают методом электроформования. Однако этот метод сложен в исполнении и требует дорогостоящего оборудования. В этой связи актуальна разработка

новых подходов к получению полых цилиндрических структур (микротрубок) на основе ХТЗ.

В работе использовали высокомолекулярный аминополисахарид ХТЗ производства ЗАО «Биопрогресс». В качестве растворителя ХТЗ использовали водный раствор ГК. В качестве агентов реакции полисоль→полиоснование использовали водные растворы гидроксида натрия (NaOH), триэаноламина (ТЭА), додецилбензосульфата натрия (ДДБСН). В качестве структурообразователя использовали ПЭО производства Sigma-Aldrich. Микротрубки получали методом, сочетающим стадии «мокрого» и «сухого» формования. На стадии мокрого формования реакция полимераналогичного превращения полисоль→полиоснование, сопровождающаяся фазовым разделением полимерной системы, протекала на границе двух жидких фаз: раствор хитозана – раствор высаливателя. На стадии сухого формования химическая реакция протекала на границе твердая фаза – жидкая фаза.

Методы исследования: вискозиметрия (вискозиметр Оствальда с диаметром капилляра 0.56 мм), реология (ротационные вискозиметры Rheotest RN-4.1, Anton Paar серии Physica MCR 302), рефрактометрия (рефрактометр Mettler Toledo RM-40), рентгеновская дифрактометрия (дифрактометр ДРОН-3 с излучением Cu-K<sub>α</sub> при  $U = 22$ кВ и  $J_{\alpha} = 20$  мА), физико-механический анализ (разрывная машина Tinius Olsen H1KS), сканирующая электронная микроскопия (микроскоп MIRA\LMU, напряжение 15 кV, проводящий ток 400 pA.), спектроскопия (микропланшетный фотометр STAT FAX 4200,  $\lambda = 545$  нм).

### **Гидродинамические и реологические свойства растворов хитозана**

Согласно современным представлениям гидродинамические и реологические свойства исходного формовочного раствора ХТЗ оказывают непосредственное влияние на условия получения и физико-механические свойства готового материала. Поэтому, на первом этапе исследовано гидродинамическое поведение макромолекул ХТЗ в разбавленных растворах.

Установлено, что при ионной силе водного раствора ГК проявляется полиэлектролитное набухание макромолекулярного клубка ХТЗ. Для подавления полиэлектролитного эффекта в раствор вводили сильный низкомолекулярный электролит NaCl. С увеличением ионной силы наблюдается прямолинейная зависимость числа вязкости от концентрации. При этом предельное число вязкости  $[\eta]$  уменьшается. Экстраполяция полученных значений  $[\eta]$  на бесконечно большую ионную силу среды позволило получить значение  $[\eta]_{\infty} \approx 4.6$  дл/г. Данное значение характеризует размер полииона с практически полностью скомпенсированным зарядом, т.е. отвечающее состоянию макромолекул аналогичного неионогенного полимера. Полученное значение  $[\eta]_{\infty}$  для растворов ХТЗ в ГК достаточно высокое. Можно предположить, что макромолекулы ХТЗ в исследуемом растворе принимают форму рыхлого клубка сравнительно большого размера.

На следующем этапе изучены реологические свойства растворов ХТЗ. Показано, что вязкость разбавленных растворов практически не зависит от напряжения сдвига. На реограммах умеренно-концентрированных растворов проявляется область структурной вязкости. Из концентрационной зависимости наибольшей ньютоновской вязкости определена концентрация начала формирования флуктуационной сетки зацеплений, которое оказалась равной 2.4 г/дл.

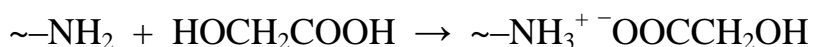
Известно, что функциональные добавки в растворах полимеров определяют свойства полимерной системы, а также получаемых на ее основе материалов. Например, введение в растворы ХТЗ высокомолекулярного ПЭО усиливает межмолекулярные взаимодействия и увеличивает прочность флуктуационной сетки зацеплений [4]. Поэтому к растворам ХТЗ в ГК вводили добавки ПЭО. Исследованы реологические свойства полученной системы. Установлено, что добавка ПЭО не изменяет характер реограмм (наблюдается область структурной вязкости). Отличие заключается только в увеличении вязкости хитозансодержащей системы.

Исследованы динамические модули упругости и потерь для растворов ХТЗ в ГК без и с добавкой ПЭО. Значения динамических модулей равномерно возрастают с увеличением частоты деформирования, что характерно для вязкотекучего состояния системы. Из температурной зависимости динамических модулей установлено, что для растворов ХТЗ в ГК вязкотекучее состояние сохраняется до температуры 65°C. Введение добавки ПЭО повышает термоустойчивость системы. Температура потери текучести увеличивается до 85°C.

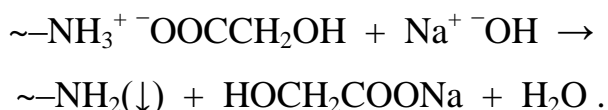
### Получения и свойства микротрубок хитозана

Основываясь на полученных экспериментальных данных был разработан способ получения микротрубок ХТЗ по растворной технологии. Получение базируется на проведении реакции полимераналогичного превращения полисоль→полиоснования. Рассмотрим протекающие при этом химические превращения.

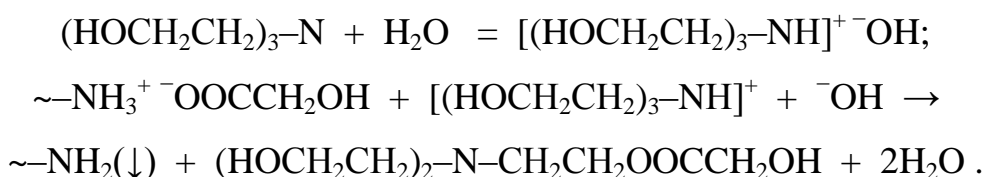
В исходном водно-кислом растворе ХТЗ находится в форме полисоли.



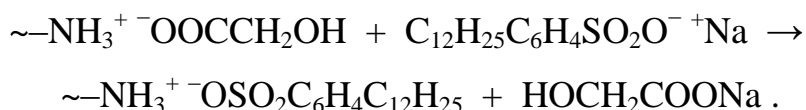
Установлено, что при использовании NaOH химическая реакция протекает по механизму солевого осаждения.



По аналогичной схеме реакция протекает и при использовании ТЭА:



В случае использования в качестве высаливателя ДБСН формирование стенок микротрубок идет по механизму ионотропного гелеобразования, в результате образуется ПАВ-полиэлектролитный комплекс:



Процесс формирования стенки микротрубки заключается в том, что на начальном этапе образуется внешний слой конденсированной фазы. Далее формируются внутренние слои. На примере кинетики показателя преломления NaOH определена концентрация высаливателя, пошедшая на реакцию. Она составила 0.235 моль/л.

Далее исследовано влияние различной природы высаливателя на структуру и морфологию поверхности стенки микротрубки. Установлено, что природа высаливателя оказывает влияние на структуру внутренней и внешней поверхности микротрубок ХТЗ. Использование системы высаливателей ТЭА-NaOH приводит к формированию пористой структуры с размером пор  $D = 0.90 - 1.47$  мкм. Замена на стадии сухого формования NaOH на ДБСН сопровождается уменьшением размеров пор до  $D = 0.80 - 0.95$  мкм. Применение ДБСН на стадиях «мокрого» и «сухого» формования приводит к образованию практически гладкой поверхности.

Исследовано влияние ПЭО на морфологию стенки микротрубок ХТЗ. Микротрубки, полученные из аналогичного раствора ХТЗ, но с добавлением ПЭО, также имеют пористую структуру. Но размер пор при этом увеличивается до  $D = 1.68 - 3.27$  мкм. Для всех образцов наблюдается слоистая структура стенки микротрубки.

Проведена рентгеновская дифрактометрия образцов. Показано, что для микротрубок характерна аморфнокристаллическая структура. Степень кристалличности ХТЗ в микротрубке составила ~50%. Для сравнения, в пленках, полученных методом полива растворов того же образца, степень кристалличности составляет ~55%, а методом «сухо-мокрого» формования – ~60%. Для исходного ХТЗ степень кристалличности составляет ~40%. Более высокие значения степени кристалличности ХТЗ в микротрубки и пленке может быть связано с большей структурной упорядоченностью кристаллической фазы полимера в полученных образцах по сравнению с исходным сырьем. Можно предположить, что структура ХТЗ в микротрубке подобна структуре ХТЗ в пленках.



Исследованы упруго-пластические свойства микротрубок. Деформационные кривые образцов микротрубок ХТЗ без добавки ПЭО показывают вынужденно-эластическую деформацию, характерную для вязкоупругих материалов. Данные образцы деформируются при растяжении с образованием шейки вследствие реализации эффекта текучести. По полученным физико-механическим характеристикам сделан вывод, что наиболее прочные образцы образуются при использовании в качестве высушителя NaOH ( $\approx 6.0$  МПа), либо ПАВ ( $\approx 7.0$  МПа).

Исследовано влияние добавок ПЭО на упруго-пластические свойства микротрубок ХТЗ. Деформационные кривые образцов микротрубок ХТЗ, полученные в системе перевода ТЭА-NaOH, деформируются характерно для вязкопластичных материалов. Кривые имеют участок упругой деформации, величина которой составляет  $\sim 3 - 4\%$ , и пластической деформации, которая протекает однородно без образования зуба текучести. Для образцов, полученных с использованием высушителей NaOH – NaOH, наблюдается другой характер зависимости «нагрузка-удлинение», характерный для вязкоупругих материалов.

### **Ферментативная биодеградация микротрубок хитозана**

Основываясь на полученных упруго-пластических характеристиках для проведения биодеградации выбраны образцы, сформированные полученные из раствора ХТЗ в ГК в системе перевода NaOH – NaOH.

Биодеградацию исследовали *in vitro*. Модельной системой стал ферментативный раствор лизоцима. В качестве контроля использовали фосфатный буфер. Процесс контролировался по убыли массы образцов. Вес микротрубок после 30 сут ферментативного гидролиза уменьшился на 12%. К концу эксперимента (180 сут) убыль массы составила 28%. За все время эксперимента в контрольной системе убыль массы образцов оказалась равной 10%.

В процессе ферментативной деструкции на стенках микротрубки фиксировали появление дефектов. Для их визуализации снимали СЭМ –

фотографии. В течение первых 90 сут на поверхности стенки никаких морфологических изменений не наблюдалось. После 120 сут на поверхности стенки микротрубки образовались микропоры и объемные дефекты в виде углублений во внутренние слои микротрубки ХТЗ. Через 150 сут эксперимента увеличился не только размер пор, но и их количество по всей поверхности стенки. По истечении 180 сут эксперимента микрорельеф стенки приобрел ярко выраженную рыхлую структуру.

В итоге можно констатировать, что под действием лизоцима микротрубка ХТЗ подвергается биодеструкции. Можно предположить, что данный процесс обусловлен разрывом  $\beta$  - (1, 4) – гликозидной связи макроцепей.

### Заключение

1. Исследованы гидродинамические свойства и реологические параметры растворов ХТЗ в гликолевой кислоте концентрации  $C = 0.15 - 4.5$  мас.% без и с добавлением полиэтиленоксида. Определены: предельное число вязкости поликатиона ( $[\eta] = 7.4 - 4.5$  дл/г при  $I = 0.19 - 0.69$  г/дл) и полииона с компенсированным зарядом ( $[\eta_{\infty}] = 4.6$  дл/г), концентрация формирования флуктуационной сетки зацеплений  $C_{кр} = 2.4$  г/дл. Получены реограммы вязкости. Проанализированы частотные зависимости динамических модулей упругости и потерь. Установлено, что переход из состояния вязкоупругой жидкости в вязкоупругое тело реализуется при температуре  $65^{\circ}\text{C}$ . Добавление ПЭО повышает температуру этого перехода до  $85^{\circ}\text{C}$ .

2. Получены микротрубки ХТЗ способом «сухо-мокрого» формования, предусматривающим межфазную реакцию полимераналогичного превращения полисоль  $\rightarrow$  полиоснование с использованием в качестве высаливателей NaOH, ТЭА и ДБСН. Предположен возможный механизм формирования структуры стенки микротрубки.

3. Проведены оценки морфологии поверхности микротрубок ХТЗ. Установлено, что для всех образцов характерна пористая слоистая структура с диаметром пор 0.9 – 1.3 мкм. Добавление ПЭО увеличивает размер пор до 3 мкм.

4. Исследованы упруго – пластические свойства и физико – механические параметры микротрубок ХТЗ без и с добавкой ПЭО. Установлено, что микротрубки деформируются характерно для двух видов полимерных материалов: вязкопластичных и вязкоупругих. Эластичность образцов без добавки ПЭО варьируется в диапазоне ~22 – 35%, разрывное напряжение 2.5 – 11.5 МПа. Добавление полиэтиленоксида не влияет на прочность, но увеличивает эластичность микротрубок ХТЗ до 30 – 45%.

5. Проведены опыты по оценке биodeградации микротрубок в ферментативной среде лизоцима. Убыль массы за 6 месяцев ферментативного гидролиза составила ~30%. Высказано предположение, что процесс биodeградации ХТЗ в ферментативной среде происходит с разрывом  $\beta$ -(1-4)-гликозидной связи макроцепи.

### Список литературы

1. Pan Z., Ding J. Review. PLGA scaffolds for tissue engineering // Interface Focus. 2012. Vol. 5. No.2. P. 366-377.
2. Smith M.J., Mc Clure M.J., Sell S.A., Barnes C.P., Walpoth B.H., Simpson D.G., Bowlin G.L. Suture-reinforced electrospun polydioxanone–elastin small-diameter tubes for use in vascular tissue engineering: A feasibility study // Acta Biomaterialia. 2008. Vol. 4. No. 1. P. 58-66.
3. Modrzejewska Z, Eckstein W. Chitosan hollow fiber membranes. // Biopolymers. 2004. Vol. 73. P.61–68.
4. Колсанова Е.В., Шмаков С.Л., Шиповская А.Б. Система хитозан-уксусная кислота-вода с добавкой полиэтиленоксида и нетканые материалы на ее основе // LAP Lambert Academic Publishing. 2014. 236 с. ISBN 978-3-659-19126-8

## **Список публикаций по теме исследований**

### **Статьи в журналах**

1. Gegel N.O., Shipovskaya A.B., Vdovykh L.S., Babicheva T.S. Preparation and Properties of 3D Chitosan Microtubes// J. Soft Matt. 2014 , Article ID 863096, 9 pages
2. Гегель Н.О., Бабичева Т.С., Шиповская А.Б. Особенности получения микротрубок хитозана межфазной реакцией полимераналогичного превращения // Бутлеровские сообщения. 2015. Т.41. № 3. С.44-53.
3. Babicheva T.S., Gegel N.O., Shipovskaya A.B. Influence of the salting-out agent nature on the strength properties of chitosan microtubes // J. Nat. Sci. Sustainable Techn. (JNSST). 2015. V.9. №2. P.285-295.

### **Статьи в сборниках научных трудов**

4. Гегель Н.О., Бабичева Т.С., Шиповская А.Б. Технология получения хитозановых микротрубок как перспективной модели биodeградируемых протезов кровеносных сосудов // «Биотехнология и качество жизни». Сб. тез. Международ. научно-практич. конф. г. Москва. 2014. С. 512-513.
5. Бабичева Т.С. , Гегель Н.О., Шиповская А.Б. , Вдовых Л.С. Получение и физико-механические свойства микротрубок хитозана, полученных сухим способом формования // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Матер. двенадцатой международ. конф.
6. Бабичева Т.С., Гегель Н.О., Шиповская А.Б. Вискозиметрические свойства растворов хитозана в гликолевой кислоте // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сб. науч. трудов X Всероссийск. конф. молодых ученых. Саратов: Изд-во «Саратовский источник». 2015. С. 77-80.
7. Гегель Н.О., Бабичева Т.С., Шиповская А.Б., Голядкина А.А., Полиенко А.В. Комплексное моделирование сосудистого протеза из хитозана // Практическая биомеханика: матер. докл. Всероссийск. конф. мол. уч. с международ. уч. Саратов: Изд-во Буква. 2015. С. 117-118.
8. Бабичева Т.С., Гегель Н.О., Шиповская А.Б. Влияние ионной силы на вязкостные свойства разбавленных растворов хитозана в гликолевой кислоте. «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2015»: матер. Всероссийск. шк.-семинара. Саратов. Изд-во Саратовский источник. 2015. С.198-200.

### **Тезисы докладов**

9. Бабичева Т.С., Гегель Н.О., Шиповская А.Б. Исследование растворов хитозана в гликолевой кислоте методами молекулярной гидродинамики и гидромеханики // Тез.докл. III Всероссийск. науч. конф. «Теоретические и экспериментальные

исследования процессов синтеза, модификации и переработки полимеров». Уфа. РИЦ БашГУ. 2015. С.61-63.

10. Babicheva T.S., Gegel N.O., Shipovskaya A.B. Microtubes from a chitosan solution in glycolic acid using dry spinning method // *Compositional Analysis of Polymers. An Engineering Approach*. Apple Academic Press Inc. 2016. P. 345-358.

11. Babicheva T.S., Gegel N.O., Shipovskaya A.B. Production of Microtubes from a Chitosan Solution in Glycolic Acid // *Materials Chemistry. A Multidisciplinary Approach to Innovative Methods* / Editors: K. Friedrich (PhD), G.E. Zaikov (DSc), A.K. Naghi (PhD). Hard ISBN: 9781771882514. E-Book SBN: 9781771882521.

12. Бабичева Т.С. Получение и свойства биodeградируемых 3D микротрубок хитозана. Матер. Международ. мол. науч. форума «ЛОМОНОСОВ-2015» [Электронный ресурс] М.: МАКС Пресс, 2015.

13. Гегель Н.О., Бабичева Т.С., Шиповская А.Б. Хитозан — перспективный полимер для получения протезов кровеносных сосудов // Тез. докл. Международ. симпозиума «Химия для биологии, медицины, экологии и сельского хозяйства». Санкт-Петербург. ИХС РАН.2015. С.76.

#### **Патент**

14. Гегель Н.О., Шиповская А.Б., Бабичева Т.С., Вдовых Л.С., Селезнева А.Г. Способ получения микротрубок из хитозана (варианты). Патент № 2564921. 17с. // Б.И. 2015. № 28.