

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ»

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БИОСОВМЕСТИМЫХ
НАНОЧАСТИЦ ХИТОЗАНА**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки II курса 251 группы
направления 04.04.01 – «Химия»

Института химии

Сбитневой Софии Вячеславовны

Научный руководитель:

Зав. кафедрой полимеров
на базе ООО «АКРИПОЛ»,
д.х.н., профессор

А.Б. Шиповская

(подпись, дата)

Зав. кафедрой полимеров
на базе ООО «АКРИПОЛ»,
д.х.н., профессор

А.Б. Шиповская

(подпись, дата)

Саратов 2020

Введение

Актуальность работы. Новые поколения лекарственных средств характеризуются высокой эффективностью, отсутствием побочных эффектов, предполагают направленный транспорт лекарственного вещества и его векторное действие в зоне запланированной локализации [1]. Перспективным полимером для создания лекарств и вакцин нового поколения является хиральный аминополисахарид хитозан [2, 3] вследствие его биосовместимости, цитонетоксичности, гипоаллергенности, способности к регенерации тканей, биорезорбируемости в метаболической среде [4, 5]. При этом наибольшим потенциалом обладают наноразмерные хитозансодержащие структуры [6]. Однако, разработанные в настоящее время методики получения наночастиц хитозана являются многостадийными, требуют дорогостоящего оборудования и зачастую предполагают использование сшивающих реагентов, приводящих к образованию токсичных побочных продуктов [7]. Последнее негативно влияет на биосовместимость и другие биохимические свойства готового материала, что ограничивает его применение в медицинской практике.

Не растворимость хитозана в воде определяет некоторые сложности получения материалов на основе данного полисахарида. Как известно, хитозан растворяется только в кислых средах [8]. Использование биосовместимых кислот для растворения хитозана определяет возможность получения биосовместимых наночастиц хитозана. В настоящей работе в качестве добавки для растворения полисахарида была выбрана *L*-аспарагиновая кислота. Выбор данной кислоты обусловлен ее уникальными биологическими функциями. *L*-аспарагиновая кислота встречается в организме как в свободном виде, так и в составе белков, выполняет роль нейромедиатора, проявляет антимикробное действие [9].

Ранее при написании бакалаврской работы было установлено, что при растворении хитозана в водном растворе *L*-аспарагиновой кислоты в результате протонирования аминогрупп полимера образуется полисоль –

аспарагинат хитозана. Растворы аспарагината хитозана кинетически нестабильны и в течение 24-25 часов хранения в условиях комнатной температуры и нормальном атмосферном давлении наблюдается фазовое разделение с выпадением мелкодисперсного осадка. Формирование новой фазы, предположительно наноразмерной на начальном этапе зародышеобразования, позволяет рассматривать исследуемую полисоль аспарагината хитозана как потенциальный источник получения биологически-активных наночастиц.

Цель данной работы – получение и характеристика наночастиц хитозана. Для достижения вышеуказанной цели были поставлены следующие **задачи**:

– Исследование кинетики физико-химических характеристик (вязкость, электропроводность, рН, показатель преломления, оптическая активность) системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – вода в процессе ее фазового разделения с целью изыскания оптимальных условий для получения наночастиц хитозана.

– Изучение влияния низкомолекулярного электролита на свойства растворов хитозана в *L*-аспарагиновой кислоте и их стабильность во времени.

– Определение влияния концентрации полимера, температуры среды на электрохимические свойства растворов аспарагината хитозана.

– Исследование оптической активности водной системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота.

– Получение (микро)наночастиц аспарагината хитозана в водных растворах. Выделение, визуализация и определение ζ -потенциала полученных при различных условиях дисперсий.

– Изыскание оптимальных условий фазового разделения хитозансодержащей системы для формирования наноразмерных частиц.

– Исследование состава частиц хитозана. Получение доказательств присутствия (отсутствия) в составе частиц солевой формы хитозана.

– Изучение биосовместимости полученных нанодисперсий аспарагината хитозана.

В качестве **объектов** исследования использовали водные системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота, хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – хлорид натрия, хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – тетраглицеролат кремния и воздушно-сухие (микро)наночастицы хитозана, выделенные из соответствующих систем. В качестве исходных материалов использовали хитозан с молекулярной массой 200 кДа, степенью деацетилирования 82 моль.% производства ЗАО «Биопрогресс» (г. Щелково); *L*-аспарагиновую кислоту производства ЗАО «Биоамид» (г. Саратов) аналитической степени чистоты; тетраглицеролат кремния (лабораторный образец), дистиллированную воду, *n*-бутиловый спирт, изопропиловый спирт, гидроксид натрия и хлорид натрия.

Структура и объем работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения и списка используемых источников, включающего 102 наименований. Работа изложена на 65 листах машинописного текста, содержит 31 рисунок и 10 таблиц.

Основное содержание работы

1. Изучение кинетики физико-химических свойств системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – вода для изыскания условий управления процессом фазового разделения

С целью управления процессом фазового разделения для получения наночастиц хитозана исследованы изменения физико-химических свойств (рН, удельная электропроводность, относительная вязкость) системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – вода во времени.

В течение первых ~24 часов, когда визуальное фазовое разделение полимерной системы еще не наблюдается, значения рН и $\kappa_{уд}$ во времени закономерно увеличиваются, а $\eta_{отн}$ – уменьшается. Эти изменения более

интенсивны в первые 2 – 3 часа с момента приготовления растворов и в наибольшей степени характерны для растворов с наибольшей концентрацией хитозана. Далее наблюдается снижение рН, удельной электропроводности и относительной вязкости системы. При этом понижение $\eta_{\text{отн}}$ систем с $C_{\text{ХТЗ}} = 0.04 - 0.15$ г/дл составило всего лишь 7 – 10%, а $C_{\text{ХТЗ}} = 0.6$ г/дл – 23%.

Был проведен сравнительный анализ кинетики рН и относительной вязкости растворов аспарагината хитозана без и с добавлением низкомолекулярного электролита. При добавлении низкомолекулярного электролита система стабилизируется, наблюдается незначительное повышение рН раствора со временем в сравнении с бессолевой раствор аспарагината хитозана.

Относительная вязкость солевого раствора значительно ниже, чем без добавления электролита. Это обусловлено компактизацией макромолекулярного клубка. Для бессолевого раствора понижение относительной вязкости наблюдалось на 23%, для солевого водного раствора всего лишь на 5%, что так же свидетельствует о стабилизации системы при добавлении низкомолекулярного электролита.

2. Электрохимические свойства растворов раствора аспарагината хитозана

Для более детального изучения процесса фазового разделения были исследованы электрохимические характеристики водной системы хитозан-аспарагиновая кислота.

Концентрационная зависимость эквивалентной электропроводности аспарагиновокислых растворов хитозана в координатах уравнения Кольрауша ($\lambda = f(\sqrt{C_{\text{ХТЗ}}})$) типична для слабых полиэлектролитов. Характер зависимости указывает, что лишь часть противоионов находится в объеме раствора. Повышение значений эквивалентной электропроводности с уменьшением концентрации хитозана обусловлено увеличением количества анионов за счет ослабления ионных взаимодействий с поликатионом.

Об этом же свидетельствуют рассчитанные по уравнению Освальда условная константа диссоциации K_d и степень диссоциации. С повышением концентрации полимера с 0.04 до 0.6 г/дл значения K_d снижаются в среднем на ~87%.

Температурные зависимости условной константы и степени диссоциации практически прямолинейны, но при температуре 60-70°C появляется излом, свидетельствующий, вероятно, о конформационных изменениях макромолекул хитозана.

Кондуктометрические политермы водных растворов аспарагината хитозана также характеризуются прямолинейной монотонно возрастающей зависимостью.

Рассчитана энергия активации электропроводности. Энергия активации электропроводности в зависимости от концентрации хитозана в растворе незначительно возрастает от 10.6 до 12.9 кДж/моль.

3. Титрование водных суспензий хитозана аспарагиновой кислотой и определение проводимости растворов

С целью определения концентрации аспарагиновой кислоты, необходимой для полного растворения суспензий хитозана, было проведено кондуктометрическое титрование водных суспензий хитозана *L*-аспарагиновой кислотой, а также построены зависимости. Все зависимости характеризовались двумя прямолинейными участками. На основании данных зависимостей графически были найдены точки эквивалентности, которые соответствуют количеству протонов, необходимых для получения гомогенного раствора. С повышением концентрации хитозана закономерно увеличивается объем кислоты.

4. Оптическая активность системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – вода

Исследовали оптическую активность свежеприготовленных растворов хитозана в *L*-аспарагиновой кислоте при разном мольном соотношении

компонентов. В исследуемом диапазоне длины волны спектр удельного оптического вращения (ДОВ) как индивидуального водного раствора *L*-аспарагиновой кислоты, так и растворов хитозана в *L*-аспарагиновой кислоте описывается монотонными кривыми ДОВ. Раствор *L*-аспарагиновой кислоты характеризуется положительными значениями $[\alpha]$, а хитозансодержащие растворы показывают отрицательные значения $[\alpha]$. Уменьшение мольного соотношения смещает кривые ДОВ в более отрицательную область значений удельного оптического вращения.

При исследовании температурных зависимостей степени диссоциации и условной константы диссоциации при температуре 60-70°C наблюдается излом, свидетельствующий, вероятно, о конформационных изменениях макромолекул хитозана. С целью доказательства конформационного перехода была исследована оптическая активность водных растворов хитозана в *L*-аспарагиновой кислоте при различных температурах. На всех зависимостях удельного оптического вращения от температуры имеется пик при 60°C, который свидетельствует об конформационном изменении макромолекулы хитозана при данной температуре.

5. Характеризация (микро)наночастиц аспарагината хитозана

Методом динамического светорассеяния был исследован ряд систем на основе хитозана - *L*-аспарагиновой кислоты и установлено влияние различных факторов (концентрации полимера, времени хранения растворов, присутствия низкомолекулярного электролита и стабилизатора) на гидродинамический размер сформированных частиц.

С увеличением концентрации хитозана гидродинамический диаметр частиц закономерно увеличивается. При концентрации хитозана не более 0.08 г/дл образуются частицы размером до 600 нм, при концентрации более 0.08 г/дл – микрочастицы с размером до 1.7 мкм. На размер частиц также влияет время хранения растворов. С увеличением продолжительности хранения растворов до 48 часов размер сформированных частиц несколько уменьшается. А через 48

часов после приготовления растворов наблюдается укрупнение частиц и их седиментация

С целью регулирования размера частиц в исследуемую систему вводили низкомолекулярный электролит. Это приводит к компактизации макромолекулярного клубка и позволяет снизить гидродинамический диаметр частиц в среднем на ~70%. При концентрации $C_{\text{NaCl}} = 0.1 \text{ М}$ и $C_{\text{ХТЗ}} \leq 0.3 \text{ г/дл}$ размер сформированных частиц аспарагината хитозана не превышает 300 нм. При более высоких концентрациях полимера $C_{\text{ХТЗ}} \geq 0.3 \text{ г/дл}$ размер частиц не превышает 60 нм.

Добавление тетраглицеролата кремния в качестве стабилизатора позволяет сохранять размер частиц до 60 суток при $C_{\text{ХТЗ}} < 0.3 \text{ г/дл}$ и до 7 суток при концентрации полимера 0.6 г/дл.

В свежеприготовленных водных растворах аспарагиновокислого хитозана присутствуют положительно заряженные частицы с ζ -потенциалом, равным 52 – 55 мВ. Величина и знак ζ -потенциала слабо зависит от концентрации полимера и времени хранения растворов.

При добавлении в систему низкомолекулярного электролита и стабилизатора наблюдается значительное снижение величины ζ -потенциала поверхности частиц в среднем на ~30-37 мВ по сравнению с частицами аспарагината хитозана в водном растворе

6. Изыскание оптимальных условий фазового разделения хитозансодержащей системы для формирования наноразмерных частиц

Для визуализации формирования нано- и микрочастиц хитозана была использована растровая электронная микроскопия. Частицы, выделенные «сухим» способом из водных систем хитозан – *L*-аспарагиновая кислота, через 24 часа выдерживания раствора характеризуются практически сферической формой и размером от 50 до 80 нм. С увеличением времени хранения системы до ~48 час размер частиц увеличивается, они приобретают вытянутую овальную (анизодиаметричную) форму и склонность к агрегации. Через ~96

час выдерживания средний размер хитозансодержащих частиц составил ~760 нм.

Несколько иные закономерности наблюдаются при выделении частиц «мокрым» способом. Введение этилового спирта (осадитель) в объем свежеприготовленной полимерной системы до появления опалесценции приводит к формированию анизодиаметричных частиц с очень большим размером от 1.0 до 1.1 мкм.

Однако, выделение частиц соосаждением на поверхности этилового спирта приводит к формированию наноразмерных частиц (50 – 80 нм) практически сферической формы.

В следующей серии опытов использовался «мокрый» способ, а также различные соосадители и подходы (подход 1 – метод микроколичеств, подход 2 – метод распыления) для формирования частиц хитозана.

Частицы хитозана, выделенные из водных систем хитозан – *L*-аспарагиновая кислота методом микроколичеств с использованием в качестве соосадителя гидроксида натрия, характеризовались сферической формой и размером 4.2 – 5.6 мкм.

При использовании изопропилового спирта в качестве соосадителя и метода распыления размер части составил 0.3 – 4 мкм, метода микроколичеств – 125 – 500 нм.

При использовании в качестве соосадителя *n*-бутилового спирта наблюдается наименьший размер (80 – 250 нм) и наибольшая концентрация частиц. Вероятно, малый размер частиц связан с относительно низкой диэлектрической проницаемостью *n*-бутилового спирта, в сравнении с изопропиловым спиртом и водным раствором гидроксида натрия.

7. ИК и ЯМР ¹Н спектроскопия аспарагината хитозана

В ходе выполнения магистерской работы были получены и исследованы методом ИК-спектроскопии сухие образцы двух систем:

1) Сухой образец нерастворимого в воде аспарагината хитозана. Для этого водный раствор хитозан – *L*-аспарагиновая кислота выдерживали во

времени до образования нерастворимого осадка ($t = 30$ сут), а затем отделяли его.

2) Воздушно сухой порошок, выделенный из свежеприготовленной водной системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота с добавкой тетраглицеролата кремния.

Для сравнительного анализа использовали ИК-спектр сухого образца аспарагината хитозана.

ИК-спектры типичны для хитозансодержащих систем. Примечательно, что во всех спектрах присутствует полоса поглощения при 1380 см^{-1} , характерная для солевой формы хитозана.

Исследованы ЯМР ^1H спектры растворов аспарагината хитозана и *L*-аспарагиновой кислоты в дейтерированной воде. Видно, что спектр раствора аспарагината хитозана включает в себя спектр аспарагиновой кислоты с небольшим химическим сдвигом.

8. Исследование биосовместимости нанодисперсий аспарагината хитозана

В отдельной серии опытов изучена биосовместимость нанодисперсий аспарагината хитозана. Установлено, что добавка в питательную среду нанодисперсий положительно влияет на скорость распластывания и пролиферацию человеческих фибробластов.

Так, через 1 ч культивирования в среде с добавкой аспарагината хитозана наблюдалось в 4 раза больше распластанных клеток, чем в контроле. В течение последующих 72-х часов в присутствии аспарагината хитозана формирование монослоя клеток шло также более быстрыми темпами. На четвертые сутки форма и размеры клеток зрелого монослоя соответствовали норме, что свидетельствует о высокой совместимости аспарагиновокислого хитозана с тканями человека и об отсутствии у него цитотоксического действия.

Заключение

1. Проведены исследования кинетики физико-химических свойств системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – вода. Обнаружено изменение во времени вязкости, электропроводности и рН, в наибольшей степени выраженное для высококонцентрированных по хитозану систем. Это приводит к фазовому разделению системы, которое начинается через ~24 часа выдерживания раствора. Добавление низкомолекулярного электролита оказывает стабилизирующее действие на водную систему хитозан – *L*-аспарагиновая кислота. Для бессолевого раствора понижение относительной вязкости при 3.5 сут хранения составило 23%, для солевого водного раствора – 5%.

2. Изучены электрохимические свойства растворов аспарагиновокислого хитозана в широком диапазоне концентраций и температур. Установлено, что хитозан относится к слабым полиэлектролитам. Рассчитанная энергия активации электропроводности аспарагината хитозана показала близкие значения с водным раствором *L*-аспарагиновой кислоты. Найдены точки эквивалентности, которые соответствуют количеству протонов, необходимых для получения гомогенного раствора.

3. Исследована оптическая активность растворов хитозана в *L*-аспарагиновой кислоте. Хирооптические свойства показывают нормальную дисперсию и отрицательный знак удельного оптического вращения. Доказано, что при температуре 60°C происходит конформационное изменение макромолекулы хитозана. Это определяет возможность получения комплементарно-стереоспецифических хиральных наночастиц хитозана.

4. Получены микро и наночастицы аспарагината хитозана, установлено влияние концентрации полимера, времени хранения растворов, присутствия низкомолекулярного электролита и стабилизатора, метода выделения на размер и форму частиц. ζ -потенциал свежеприготовленных водных растворов составил 52 – 55 мВ. Величина и знак ζ -потенциала не зависит от концентрации полимера и времени хранения растворов. При

добавлении в систему низкомолекулярного электролита и стабилизатора наблюдается значительное снижение величины ζ -потенциала.

5. Найдены оптимальные методы выделения наночастиц из водных растворов аспарагината хитозана методом нанопреципитации (соосаждения). Показано, что при использовании в качестве соосаждителя *n*-бутилового спирта формируется достаточное количество сферических наночастиц размером 80 – 250 нм.

6. Методом ИК-спектроскопии исследованы воздушно сухие порошки, выделенные из свежеприготовленной водной системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота без и с добавкой кремнийсодержащего стабилизатора, и аспарагинат хитозана, выделенный из хранившегося 30 сут водного раствора хитозан – *L*-аспарагиновая кислота. Приведенные данные свидетельствуют о том, что во всех образцах присутствует полоса поглощения при 1380 см^{-1} , характерная для солевой формы хитозана.

7. Тестирование наночастиц хитозана на биосовместимость показало, что наночастицы аспарагината хитозана не цитотоксичны и биосовместимы, поскольку не угнетают рост клеточной культуры человеческих дермальных фибробластов. Кроме того, присутствие в ростовой среде наночастиц аспарагината хитозана значительно ускоряет рост клеточной популяции фибробластов.

Список используемых источников

1. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2011. – 608 с.
2. Samal S.K., Dash M., Van Vlierberghe S., Kaplan D.L., Chiellini E., Van Blitterswijk C., Moronid L., Dubruel P. Cationic polymers and their therapeutic potential // Chem. Soc. Rev. – 2012. – Vol. 34. – №21. – P. 7147-7194.
3. Vasiliev Y.M. Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation // Exp. Rev. Vaccines. – 2015. – Vol. 14. – №1. – P. 37-53.
4. Ткачук В.А. Нанотехнологии и медицина // Российские нанотехнологии. – 2009. – Т. 4. – № 7-8. – С. 9-11.
5. Yang Y., Wang Sh., Wang Y., Wang X. Wang Q., Chen M. Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery // Biotechnology Advances. – 2014. – Vol. 32. – №7. – P. 1301-1316.
6. Grenha A. Chitosan nanoparticles: a of preparation methods // Journal of drug targeting. – 2012. – Vol. 20. – №4. – P. 291-300.
7. Ильина А.В., Варламов В.П., Ермаков Ю.А., Орлов В.Н., Скрыбин К.Г. Хитозан – природный полимер для формирования наночастиц // ДАН. – 2008. – Т. 421. – №2. – С. 199-201.
8. Филиппова О.Е., Корчагина Е.В. Хитозан и его гидрофобные производные: Получение и агрегация в разбавленных водных растворах // Высокомогл. соедин. – 2012. – Т. 54 А. – №7. – С. 1130-1152.
9. Rafey A., Shrivastavaa K.B.L., Iqbal S.A., Khan Z. Growth of Ag-nanoparticles using aspartic acid in aqueous solutions // Journal of colloid and Interface Science. – 2011. – Vol. 35. – №1. – P.190-195.

