

На правах рукописи

ПРИВАР ЮЛИЯ ОЛЕГОВНА

**КРИОГЕЛИ ХИТОЗАНА, СШИТЫЕ ДИГЛИЦИДИЛОВЫМИ ЭФИРАМИ:
ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ**

1.4.4. Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Владивосток – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте химии Дальневосточного отделения Российской академии наук
(ИХ ДВО РАН)

Научный руководитель: член-корреспондент РАН, доктор химических наук
Братская Светлана Юрьевна, заведующая лабораторией
органических и гибридных функциональных материалов
ИХ ДВО РАН

Официальные оппоненты: доктор химических наук
Веселова Ирина Анатольевна, Федеральное
государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова, профессор кафедры
аналитической химии химического факультета

кандидат химических наук, доцент
Скорик Юрий Андреевич, Филиал федерального
государственного бюджетного учреждения
«Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.
Константинова Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт» - Институт высокомолекулярных
соединений, заведующий лабораторией природных
полимеров

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Национальный
исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»

Защита состоится «__» _____ 2025 г. в «__» часов на заседании
диссертационного совета Д 24.1.145.01 при Институте химии ДВО РАН по адресу:
690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159, конф.зал.

С диссертацией можно ознакомиться в центральной научной библиотеке ДВО РАН и на
сайте ИХ ДВО РАН.

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Автореферат размещен на сайте ВАК РФ «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета к.х.н.

Бровкина О.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы¹

Интерес к материалам на основе хитозана для применения в качестве сорбентов, носителей катализаторов, средств доставки лекарств, скаффолдов для культивирования клеток и регенерации тканей неуклонно растет в последние несколько десятилетий. По сравнению с гидрогелями широкопористые материалы, к которым относят материалы с размером пор более 50 мкм, обладают рядом преимуществ. Открытая пористая структура обеспечивает эффективный транспорт жидкости через весь объем материала, более высокую механическую прочность при больших деформациях, эластичность. Для достижения требуемых эксплуатационных характеристик материалов различного назначения, полученных на основе хитозана, в большинстве случаев требуется сшивка, обеспечивающая их стабильность и нерастворимость в широком диапазоне pH. Варьирование типа и плотности сшивок влияет на количество свободных аминок групп, биосовместимость и цитотоксичность, является важным инструментом настройки механических и сорбционных свойств материалов, их устойчивости к ферментативному гидролизу.

К настоящему времени разработаны различные подходы к получению объёмных широкопористых материалов на основе хитозана. Наиболее предпочтительным подходом является формирование пористой структуры в процессе сшивки полимера, однако использование для этого темплатов в форме мицелл, эмульсий и неорганических частиц увеличивает количество стадий получения материала и может приводить к нежелательным изменениям свойств материалов из-за неполного удаления темплатов. В связи с этим особенно привлекательным способом генерации пористой структуры является криогелирование или криотропное гелеобразование, когда темплатами служат кристаллы растворителя, легко удаляемые при оттаивании. Для успешного применения данного метода к получению криогелей хитозана необходима достаточно высокая реакционная способность сшивающего агента при отрицательных температурах в кислой среде, где хитозан полностью растворим. Из спектра сшивающих реагентов, наиболее часто применяющихся для сшивки хитозана, полностью удовлетворяет этим требованиям только глутаровый альдегид (ГА). Однако материалы, сшитые ГА, отличаются токсичностью при высоких степенях сшивки, хрупкостью, нестабильностью во времени, интенсивной окраской и небольшим размером пор. В связи с этим высокую актуальность сохраняет поиск альтернативных ГА реагентов для получения криогелей хитозана.

Степень проработанности темы

Наиболее перспективным типом сшивающих реагентов для получения криогелей хитозана, на наш взгляд, являются диглицидиловые эфиры (ДЭ). Помимо высокой биосовместимости получаемых с их применением материалов, за счет высокой гидрофильности ДЭ могут

¹ СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ: АК – краситель ализариновый красный; ГА – глутаровый альдегид; ДЭ – диглицидиловый эфир; ДЭБД – диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола; ДЭПЭГ – диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля; ДЭЭГ – диглицидиловый эфир этиленгликоля; СМ – степень модификации; ХТЗ – хитозан; Т:Ж – соотношение сорбент:раствор. Криогели, сшитые ДЭЭГ, ДЭБД и ДЭПЭГ, обозначены как ДЭЭГ:ХТЗ, ДЭБД:ХТЗ и ДЭПЭГ:ХТЗ соответственно с указанием мольного соотношения сшивающий реагент:полимер: например, ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 обозначает криогель хитозана, сшитый ДЭЭГ при мольном соотношении ДЭЭГ:ХТЗ 1:4. Промытые водно-спиртовым раствором реакционные смеси через 7 суток после добавления ДЭ обозначали как гидрогели ДЭ:ХТЗ (EtOH)

обеспечить дополнительно пластифицирующий эффект, решая проблему хрупкости криогелей, сшитых ГА. Однако из-за высокой реакционной способности ДЭ только при $\text{pH} > 10$, где хитозан нерастворим, пористые материалы, сшитые ДЭ, ранее удалось получить только путем стабилизации структуры предварительно лиофилизованного хитозана (криоструктурата) в щелочной среде при $+60^\circ\text{C}$. В других работах по сшивке хитозана ДЭ в кислых средах реакцию проводили при повышенной температуре и, как правило, при мольном избытке ДЭ². Задача снижения хрупкости материалов на основе хитозана за счет использования гибкоцепных сшивающих агентов систематически не решалась, единичные успешные примеры ограничиваются введением фрагмента полиэтиленгликоля (ПЭГ) через концевую альдегидную группу, что приводит к необходимости очистки продукта реакции диализом для обеспечения высокой биосовместимости³.

Таким образом, до начала данного исследования успешных примеров применения ДЭ с разной длиной цепи для сшивки хитозана в кислых средах в частично замороженных растворах известно не было, хотя такие попытки предпринимались рядом исследователей.

Цель работы

Исследовать взаимодействие диглицидиловых эфиров (ДЭ) с хитозаном в кислой среде и разработать способ получения криогелей хитозана с настраиваемыми функциональными свойствами с применением ДЭ в качестве сшивающих реагентов.

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

1. Изучить факторы, влияющие на гелеобразование в растворах хитозана в присутствии ДЭ.
2. Установить корреляции между условиями сшивки хитозана ДЭ в частично замороженных растворах, морфологией и свойствами полученных криогелей.
3. Исследовать эффективность применения криогелей хитозана, сшитых ДЭ, в качестве сорбентов и носителей катализаторов.
4. Исследовать цитотоксичность и биосовместимость полученных криогелей хитозана, возможность их применения для культивирования клеток и регенерации тканей.

Научная новизна

1. Впервые изучены особенности гелеобразования в уксуснокислых и солянокислых растворах хитозана в присутствии ДЭ. Установлено, что причиной низкой эффективности сшивки хитозана ДЭ в уксуснокислых растворах является расход ДЭ на побочную реакцию образования сложного эфира уксусной кислоты.
2. Разработан способ получения криогелей хитозана, сшитых ДЭ. Впервые показано, что криогели хитозана могут быть получены даже при низкой концентрации ДЭ, соответствующей мольному отношению ДЭ:хитозан 1:20. Установлено, что одним из важных преимуществ ДЭ перед ГА как сшивающих реагентов является более низкая скорость сшивки, обеспечивающая формирование криогелей с большим размером пор (до 230 мкм) и более высокой проницаемостью.
3. Впервые установлены ранее неизвестные корреляции между условиями ковалентной сшивки хитозана в частично замороженных растворах, морфологией и свойствами

² Kiuchi H., Kai W., Inoue Y. Preparation and characterization of poly (ethylene glycol) crosslinked chitosan films // J. Appl. Polym. Sci. 2008. Vol. 107. No 6. P. 2823–3830.

³ Vijayan A., A. S., Kumar G.S.V. PEG grafted chitosan scaffold for dual growth factor delivery for enhanced wound healing // Sci. Rep. 2019. Vol. 9. No 1. P. 19165.

криогелей хитозана, сшитых ДЭ. Показано, что проницаемость, набухание, механические свойства и устойчивость к ферментативному гидролизу криогелей хитозана можно настраивать, изменяя длину цепи ДЭ и степень сшивки.

4. С учетом проницаемости, механических свойств и сорбционной емкости криогелей хитозана обоснованы критерии выбора ДЭ и степени сшивки для получения эффективных монолитных сорбентов и носителей катализаторов.
5. Впервые установлено, что морфология клеточных агрегатов, формирующихся при 3D культивировании в криогелях хитозана, сшитых ДЭ с разной длиной цепи, зависит от состава криогелей.

Положения, выносимые на защиту

1. Факторы, влияющие на эффективность гелеобразования в растворах хитозана в присутствии ДЭ.
2. Способ получения криогелей хитозана, сшитых ДЭ, и корреляции между условиями получения, морфологией и свойствами криогелей.
3. Результаты исследования цитотоксичности и биосовместимости криогелей хитозана, сшитых ДЭ, и их применения для 3D культивирования клеток.
4. Экспериментальное обоснование критериев выбора ДЭ и степени сшивки для получения на основе криогелей хитозана сорбентов и носителей катализаторов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Впервые показано, что длина цепи ДЭ, pH и природа кислоты, в которой растворен полимер, являются основными факторами, определяющими эффективность сшивки хитозана ДЭ как при комнатной температуре, так и в частично замороженных растворах. Установленные закономерности прохождения целевой и побочной реакций эпоксидных групп с аминогруппами хитозана в кислой среде могут быть использованы для расширения методических подходов к функционализации хитозана в гомогенных условиях без использования реагентов, содержащих альдегидную группу. Практическая значимость исследования заключается в разработке способа получения новых широкопористых высокоэластичных материалов на основе хитозана (патент РФ № 2699562) для применения в клеточных технологиях и тканевой инженерии, сорбции и катализе.

Методология и методы диссертационного исследования

Результаты диссертационной работы получены с использованием современных методов исследования, включающих ИК-Фурье спектроскопию, CHN-анализ, осцилляционную реологию, динамический механический анализ, конфокальную лазерную сканирующую микроскопию. Сорбционные свойства материалов исследованы в статических и в динамических условиях с применением для анализа UV-vis спектроскопии. Исследования цитосовместимости криогелей проведены на постоянных линиях клеток человека с применением световой микроскопии и цитометрии. Биосовместимость криогелей исследована *in vivo* на животной модели (мыши) в соответствии с общепринятыми этическими нормами и правилами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS №123).

Достоверность полученных результатов обеспечена применением совокупности взаимодополняющих физико-химических методов исследования; хорошей воспроизводимостью результатов; использованием статистических методов обработки экспериментальных данных; обсуждением установленных закономерностей на тематических российских и международных

научных мероприятиях; публикацией результатов исследования в высокорейтинговых рецензируемых научных изданиях.

Работа выполнена в лаборатории органических и гибридных функциональных материалов под руководством чл.-корр. РАН, д.х.н. С.Ю. Братской.

Личный вклад автора заключался в анализе научной литературы по теме исследования, получении и обработке основной части экспериментальных данных, участии в обсуждении полученных результатов и подготовке публикаций, докладов на конференциях, в том числе международных. Часть исследований выполнена к.б.н. Бородой А.В., Малышевым Д.Д. (3D культивирование клеток и исследование цитотоксичности методом проточной цитометрии) и к.б.н. Майоровой М.А. (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия) в ННЦМБ ДВО РАН; к.х.н. Нестеровым Д.В. (исследование биосовместимости на животной модели) в ИОС УрО РАН. Автор принимал непосредственное участие в обработке, анализе и интерпретации всех полученных данных.

Связь работы с научными программами Работа выполнена автором в соответствии с планами исследований по проекту РНФ № 20-13-00399 и государственному заданию ИХ ДВО РАН, темы № FWFN (0205)-2022-0002 и № FWFN (0205)-2025-0002.

Апробация работы

Основные положения и результаты диссертационной работы были доложены на XII научной сессии-конкурсе молодых учёных ИХ ДВО РАН, посвященной 50-летию Института химии ДВО РАН (Владивосток, 2021), диплом за 2-е место; III Зезинской школе-конференции для молодых учёных «Химия и физика полимеров» (Москва, 2023), диплом I степени; Шестнадцатой Всероссийской конференции с международным участием «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Владивосток, 2023); XIII научной сессии-конкурсе молодых учёных ИХ ДВО РАН, посвященной 300-летию Российской академии наук (Владивосток, 2024); XXII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Сочи, 2024).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано **11** печатных работ, включая **5** статей в рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы цитирования: Polysaccharides, Gels, Biomimetics, Biomacromolecules, Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives, **1** патент РФ на изобретение и **5** тезисов докладов научных конференций.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.4 – Физическая химия (химические науки) в пунктах: 3. «Определение термодинамических характеристик процессов на поверхности, установление закономерностей адсорбции на границе раздела фаз и формирования активных центров на таких поверхностях»; 9. «Связь реакционной способности реагентов с их строением и условиями осуществления химической реакции».

Структура работы

Работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка сокращений и обозначений, списка литературы из 201 наименований. Работа изложена на 134 страницах, содержит 35 рисунков, 5 схем, 4 таблицы и 2 приложения.

Содержание работы

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы ее цели и задачи, проанализирована степень разработанности темы, отражены научная новизна и практическая значимость диссертации, изложены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен литературный обзор, в котором рассмотрены способы сшивки хитозана и методы получения пористых материалов на его основе. Проведен критический анализ влияния параметров, регулируемых в процессе криотропного гелеобразования, на свойства криогелей. Обсуждены примеры практического применения пористых материалов на основе хитозана в качестве сорбентов, носителей катализаторов, скаффолдов для культивирования клеток.

Во второй главе приведены характеристики реагентов, описаны способы получения гидрогелей и криогелей хитозана, методы исследования их свойств и обработки полученных экспериментальных данных. В работе использовался хитозан со степенью деацетилирования 0.9 и молекулярной массой 30 кДа (BioLog Herre GmbH, Германия); сшивающие реагенты – диглицидиловые эфиры (ДЭ) этиленгликоля (ДЭЭГ), 1,4-бутандиола (ДЭБД) и полиэтиленгликоля с молекулярной массой ~ 500 (ДЭПЭГ). Гелеобразование в 3%-ных растворах хитозана в присутствии ДЭ при температуре +25 °С исследовали методом осцилляционной реологии. Для установления особенностей взаимодействия хитозан-ДЭ применяли метод ИК-Фурье спектроскопии с приставкой однократного нарушенного полного внутреннего отражения. Определяли следующие характеристики криогелей: элементный состав и степень модификации сшивающим реагентом (CHNS анализ), степень набухания (гравиметрия), распределение пор по размерам (конфокальная сканирующая микроскопия), проницаемость, устойчивость к ферментативному гидролизу (гравиметрия). Механические свойства криогелей исследовали методом одноосного сжатия. В главе также приведены методики исследования сорбционных свойств криогелей в статических и динамических условиях и каталитических свойств композитных криогелей, содержащих наночастицы палладия; описаны методы оценки цитотоксичности и биосовместимости криогелей.

В третьей главе обсуждаются результаты исследования гелеобразования и криотропного гелеобразования в растворах хитозана в присутствии ДЭ с разной длиной цепи и особенности механизма сшивки хитозана ДЭ в уксуснокислых и солянокислых растворах.

Гелеобразование в растворах хитозан-ДЭ

При анализе факторов, влияющих на эффективность сшивки хитозана ДЭ в кислой среде, мы исходили из того, что эта реакция протекает по механизму нуклеофильного замещения, а скорость таких реакций определяется природой нуклеофила. Все неудачные попытки сшивки хитозана ДЭ в кислой среде, известные из литературы, предпринимались в уксуснокислых растворах, часто при значительном избытке кислоты. Поскольку принципиальная возможность протекания реакции между эпоксидами и аминами не вызывает сомнений, наблюдаемую низкую эффективность сшивки хитозана можно в первую очередь связать с тем, что полностью протонированная при избытке кислоты аминогруппа хитозана не активна в реакции нуклеофильного замещения. В то же время, ацетат-ион в уксуснокислых растворах является нуклеофилом и может конкурировать с хитозаном в реакциях с ДЭ, что ранее не принималось во внимание.

На первом этапе исследования мы установили, как замена уксусной кислоты на соляную при растворении хитозана влияет на эффективность гелеобразования в 3%-ном растворе хитозана в присутствии эквимольного количества ДЭЭГ (ДЭЭГ:ХТЗ 1:1). Анализ частотных зависимостей модулей накопления и потерь показал, что через 24 ч гелеобразования в солянокислом растворе хитозана при pH 5.0 модуль накопления был в 5.9 раз выше, чем в

уксуснокислом при том же значении рН (рисунок 1А). Гели хитозана, сшитые ДЭЭГ в уксуснокислых растворах, сильно набухали и плохо держали форму. При рН 3.5 через 24 ч гелеобразования не наблюдалось также в солянокислых растворах (рисунок 1А), что подтверждает значительное влияние степени протонирования аминогруппы хитозана на эффективность его сшивки ДЭ.

Более детальное исследование зависимости времени гелеобразования от рН в солянокислых растворах хитозана показало, что скорость гелеобразования резко увеличивалась при рН >4.5, при этом в узком диапазоне рН от 5.0 до 5.5 время гелеобразования сокращалось почти в 10 раз (рисунок 1Б). Таким образом, был сделан вывод, что сшивку хитозана ДЭ следует проводить в солянокислых растворах с рН 5.0–5.5.

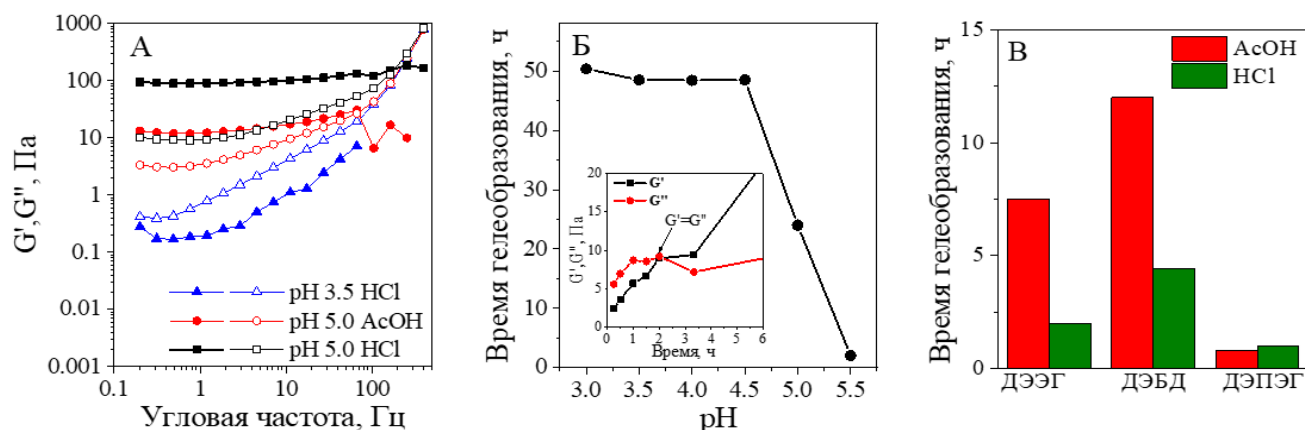


Рисунок 1 – Гелеобразование в 3%-ных уксуснокислых (AcOH) и солянокислых (HCl) растворах хитозана при мольном соотношении ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 в зависимости от рН, $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$: частотные зависимости модулей накопления (G' , заполненные символы) и потерь (G'' , пустые символы), записанные через 24 ч после добавления ДЭЭГ (А); зависимость времени гелеобразования в солянокислом растворе хитозана от рН (Б), на вставке пример определения времени гелеобразования при сшивке хитозана ДЭЭГ при рН 5.5. Зависимость времени гелеобразования в 3%-ных растворах хитозана от длины цепи ДЭ при рН 5.5 и $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (В)

В качестве еще одного фактора, влияющего на скорость сшивки хитозана ДЭ, рассматривали длину цепи сшивающего реагента. Установлено, что и в уксуснокислых, и в солянокислых растворах зависимость времени гелеобразования от длины цепи ДЭ носит аналогичный нелинейный характер. При этом в солянокислых растворах время гелеобразования было в 3-4 раза ниже, чем в уксуснокислых, при применении ДЭ с короткой длиной цепи – ДЭЭГ и ДЭБД, и практически не отличалось при применении ДЭПЭГ (рисунок 1В).

Криотропное гелеобразование в растворах хитозан-ДЭ

После установления основных закономерностей сшивки хитозана ДЭ при комнатной температуре были проанализированы факторы, влияющие на эффективность сшивки хитозана в частично замороженных растворах. На первом этапе влияние температуры на реакционную способность хитозана в реакции с ДЭ оценивали в системе ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 в солянокислом растворе при рН 5, в качестве критерия эффективности сшивки использовали максимальную скорость потока жидкости через монолитный криогель. Так, было установлено, что сшивка наиболее эффективна при температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, а 12 суток достаточно для завершения процесса (рисунок 2А). Все рассматриваемые далее криогели были получены при этих условиях.

Криогели, хорошо сохраняющие форму, были получены из солянокислых растворов хитозана с pH 5.5 в диапазоне мольных отношений ДЭ:ХТЗ от 2:1 до 1:20 для всех сшивающих реагентов. Из уксуснокислых растворов криогели удалось получить только при мольном соотношении ДЭ:ХТЗ 1:1 и выше. Низкая эффективность сшивки в уксуснокислых растворах подтверждается значениями степени набухания криогелей, которые в 6.5–6.7 раз выше, чем для криогелей, полученных из солянокислых растворов (рисунок 2Б). Исключением являются только криогели, сшитые ДЭПЭГ в уксуснокислом и солянокислом растворах, для которых степень набухания при высокой степени сшивки отличалась незначительно.

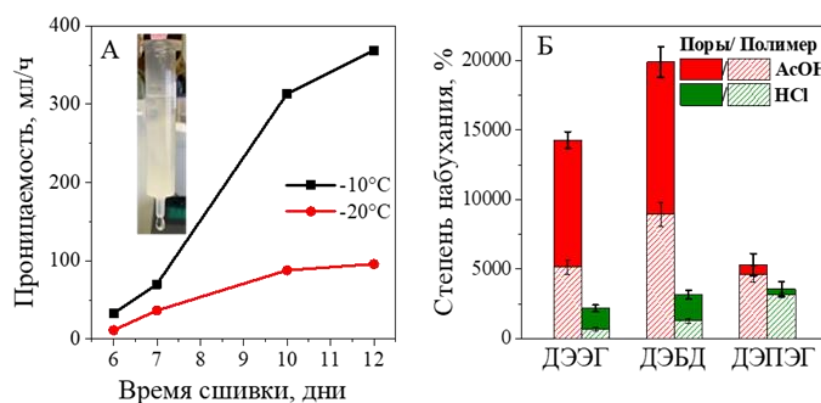


Рисунок 2 – Зависимость проницаемости криогелей ДЭЭГ:ХТЗ 1:1, полученных из солянокислых 3%-ных растворов хитозана при pH 5.0, от температуры и времени сшивки (А), на вставке – фотоизображение криогеля в колонке (А); равновесная степень набухания в воде криогелей ДЭ:ХТЗ 1:1, полученных при температуре –10 °С и времени сшивки 12 суток (Б)

Особенности механизма сшивки хитозана ДЭ в уксуснокислых и солянокислых растворах

Для объяснения причины низкой эффективности сшивки хитозана ДЭ в уксуснокислом растворе и нелинейной зависимости времени гелеобразования от длины цепи ДЭ нами были выдвинуты и проверены две гипотезы: 1) в уксуснокислых растворах сшивающий реагент расходуется на побочные реакции – этерификация уксусной кислоты (схема 1, реакция 2) и прививка сшивающего реагента в боковую цепь без образования сшивки с возможной последующей деактивацией эпоксидной группы при взаимодействии с водой или ацетат-ионом (схема 1, реакции 3, 4 и 5); 2) длина цепи ДЭ влияет на вероятность прохождения реакций сшивки или расхода сшивающего реагента на побочные реакции.

Для проверки гипотез использовали метод ИК-Фурье спектроскопии. Анализировали следующие области ИК-спектров реакционных смесей, гидрогелей (EtOH), т.е. реакционных смесей после удаления растворимых реагентов и продуктов реакции и криогелей:

- 1730–1750 см^{-1} для идентификации сложных эфиров уксусной кислоты;
- 1000–1200 см^{-1} для оценки изменений в положении и интенсивности частично перекрывающихся полос, соответствующих С–О–С связям в ДЭ (1092–1099 см^{-1}), 1,4-гликозидным связям С–О–С (1152 см^{-1}) и С–О связям (1064 см^{-1} и 1024 см^{-1}) в хитозане;
- 890–950 см^{-1} для идентификации непрореагировавших эпоксидных групп (~910 см^{-1}) в продуктах реакции на фоне полос, соответствующих валентным колебаниям 1,4-гликозидных связей в хитозане при 947 и 843 см^{-1} .

Положение полос в ИК-спектрах и их относительные интенсивности позволяют однозначно подтвердить образование сложного эфира, наличие непрореагировавших эпоксидных групп, а также качественно оценить изменение отношения ДЭ:ХТЗ в продукте реакции (гидрогели (EtOH) и криогели) относительно исходной реакционной смеси.

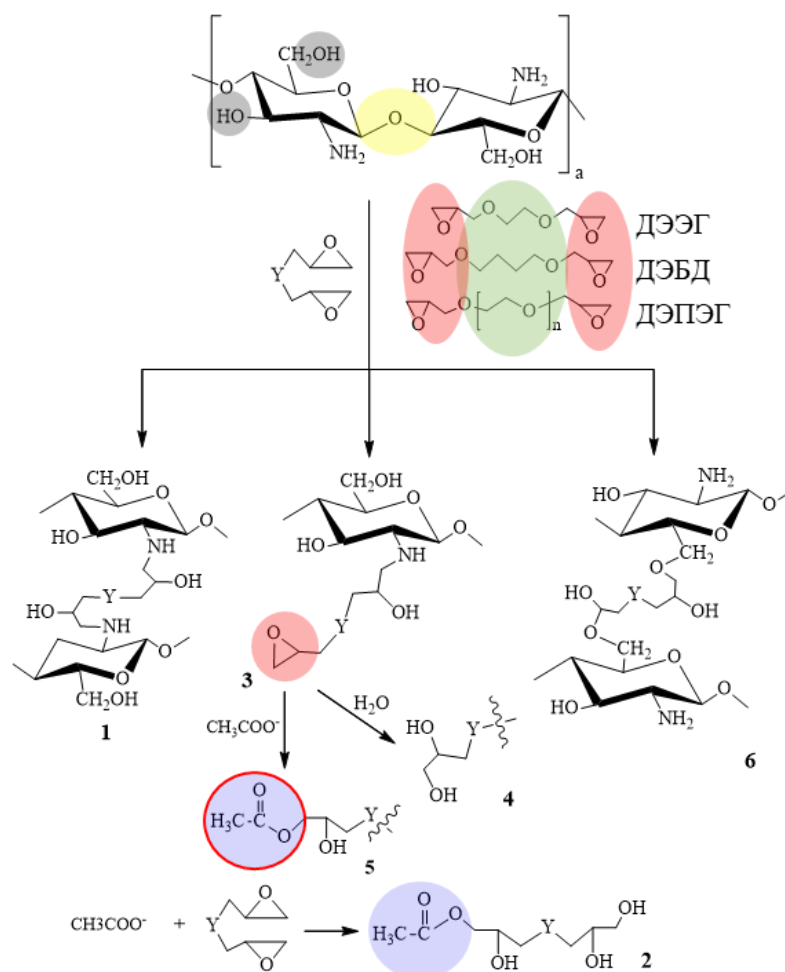


Схема 1 – Возможные реакции в солянокислых (1, 3, 4, 6) и уксуснокислых (1-6) растворах хитозан-ДЭ. Цветовые обозначения структурных мотивов на схеме аналогичны цветовым обозначениям соответствующих им полос в ИК-спектрах на рисунках 3-5

При сравнении ИК-спектров реакционных смесей хитозан-ДЭ в уксуснокислых и солянокислых растворах через 7 дней после начала реакции установлено, что в уксуснокислых растворах, действительно, появляется полоса при 1735 см^{-1} , соответствующая сложному эфиру, что подтверждает протекание побочной реакции этерификации (схема 1, реакции 2, 5) в присутствии ДЭ как с короткой (ДЭЭГ), так и с длинной цепью (ДЭПЭГ) (рисунки 3А и Б).

При этом в ИК-спектрах гидрогелей (EtOH), полученных в результате удаления растворимых продуктов реакции и непрореагировавших исходных реагентов, интенсивность полосы сложного эфира значительно снижается, что свидетельствует о преимущественном прохождении побочной реакции этерификации без участия хитозана (схема 1, реакция 2). В то же время, наличие небольшого пика или плеча в области 1735 см^{-1} в ИК-спектрах гидрогелей (EtOH) не исключает этерификацию концевой эпоксидной группы привитого к хитозану фрагмента ДЭ (схема 1, реакция 5).

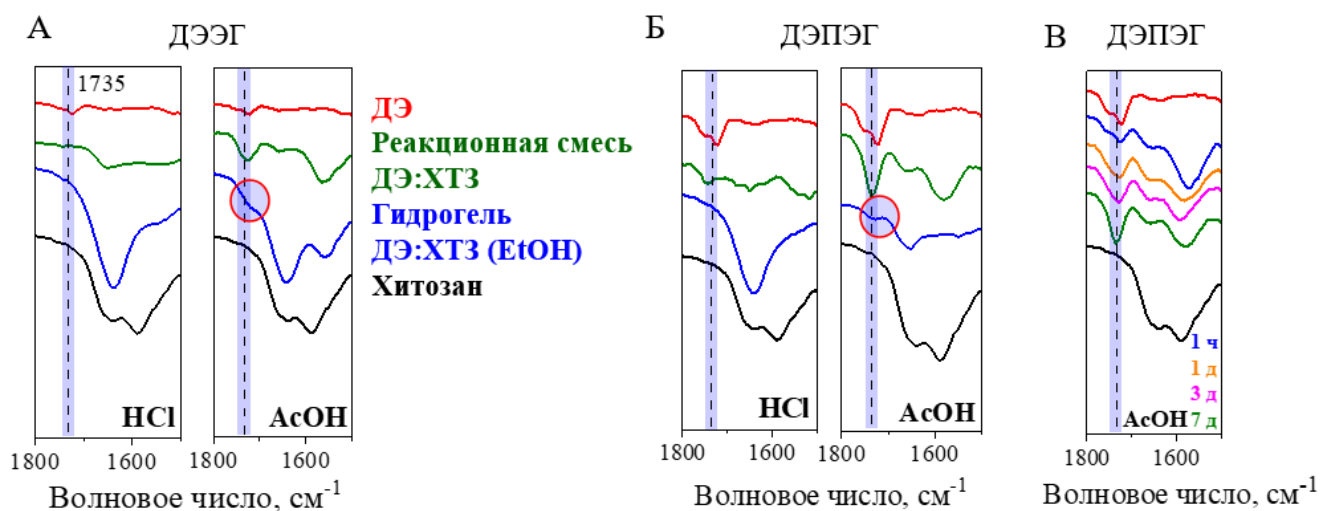


Рисунок 3 – ИК-Фурье спектры реакционных смесей и гидрогелей (EtOH) ДЭ:ХТЗ 1:1: сшивка ДЭЭГ (А) и ДЭПЭГ (Б) в 3%-ных солянокислых (HCl) и уксуснокислых (AcOH) растворах хитозана при pH 5.5 в течение 7 дней. ИК-Фурье спектры реакционной смеси ДЭПЭГ:ХТЗ 1:1 через 1 час (1ч) и 1, 3, 7 дней (1д, 3д, 7д соответственно) после добавления ДЭПЭГ (В). ИК-спектры хитозана и ДЭ приведены для сравнения

Из сопоставления ИК-спектров (рисунок 3В) и реологических кривых (рисунки 4Г и Д) видно, что в течение 7 суток с увеличением интенсивности полосы эфирной группы в реакционной смеси ДЭПЭГ:ХТЗ 1:1 увеличивался и модуль накоплений. Таким образом, побочная реакция этерификации идет параллельно с целевой реакцией сшивки. Отношение модулей накоплений в уксуснокислых реакционных смесях ДЭПЭГ:ХТЗ 1:1 и ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 ($G'_{\text{дэпэг}}/G'_{\text{дээг}}$) равное 8.3 через 1 день после добавления ДЭ (рисунки 4Г и Д) свидетельствует о протекании целевой реакции сшивки быстрее и эффективнее при применении сшивающего реагента с большей длиной цепи – ДЭПЭГ. Хотя из литературных данных известно, что уксусная кислота является более эффективным катализатором реакций аминов с ДЭ, чем соляная⁴, в исследуемой системе более низкая реакционная способность хитозана по сравнению с низкомолекулярными аминами приводит к тому, что значительное количество ДЭ расходуется на побочную реакцию с уксусной кислотой быстрее, чем происходит сшивка хитозана.

Методом ИК-Фурье спектроскопии мы проанализировали наличие нераскрытых эпоксидных колец в уксуснокислых и солянокислых реакционных смесях с ДЭЭГ и ДЭПЭГ через 1, 3 и 7 дней после добавления сшивающего реагента. По изменению интенсивности полосы при 910 см^{-1} видно, что для обоих сшивающих реагентов скорость раскрытия эпоксидных колец в солянокислых растворах ниже, чем в уксуснокислых (рисунки 4А и Б). При этом в уксуснокислом растворе нераскрывшиеся эпоксидные кольца не идентифицируются уже через 24 ч в реакционной смеси ДЭЭГ:ХТЗ 1:1, но сохраняются через 72 ч в смеси ДЭПЭГ:ХТЗ 1:1. Эти данные коррелируют с близкими временами гелеобразования в солянокислом и уксуснокислом растворах при сшивке ДЭПЭГ (рисунок 1В), а также с более высокой эффективностью сшивки ДЭПЭГ по сравнению с ДЭЭГ в уксуснокислом растворе, что хорошо видно из отношений модулей накопления $G'_{\text{HCl}}/G'_{\text{AcOH}}$ равных 5.1 и 1.5 через 7 дней сшивки хитозана ДЭЭГ и ДЭПЭГ

⁴ Shechter L., Wynstra J., Kurkij R.P. Glycidyl ether reactions with amines // Ind. Eng. Chem. 1956. Vol. 48. No 1. P. 94–97.

соответственно (рисунки 4Г и Д). Таким образом, более резкое падение эффективности ДЭЭГ в реакции сшивки в уксуснокислом растворе связано с его более высокой реакционной способностью, приводящей к более быстрому расходу реагента на побочную реакцию, которая протекает легче целевой.

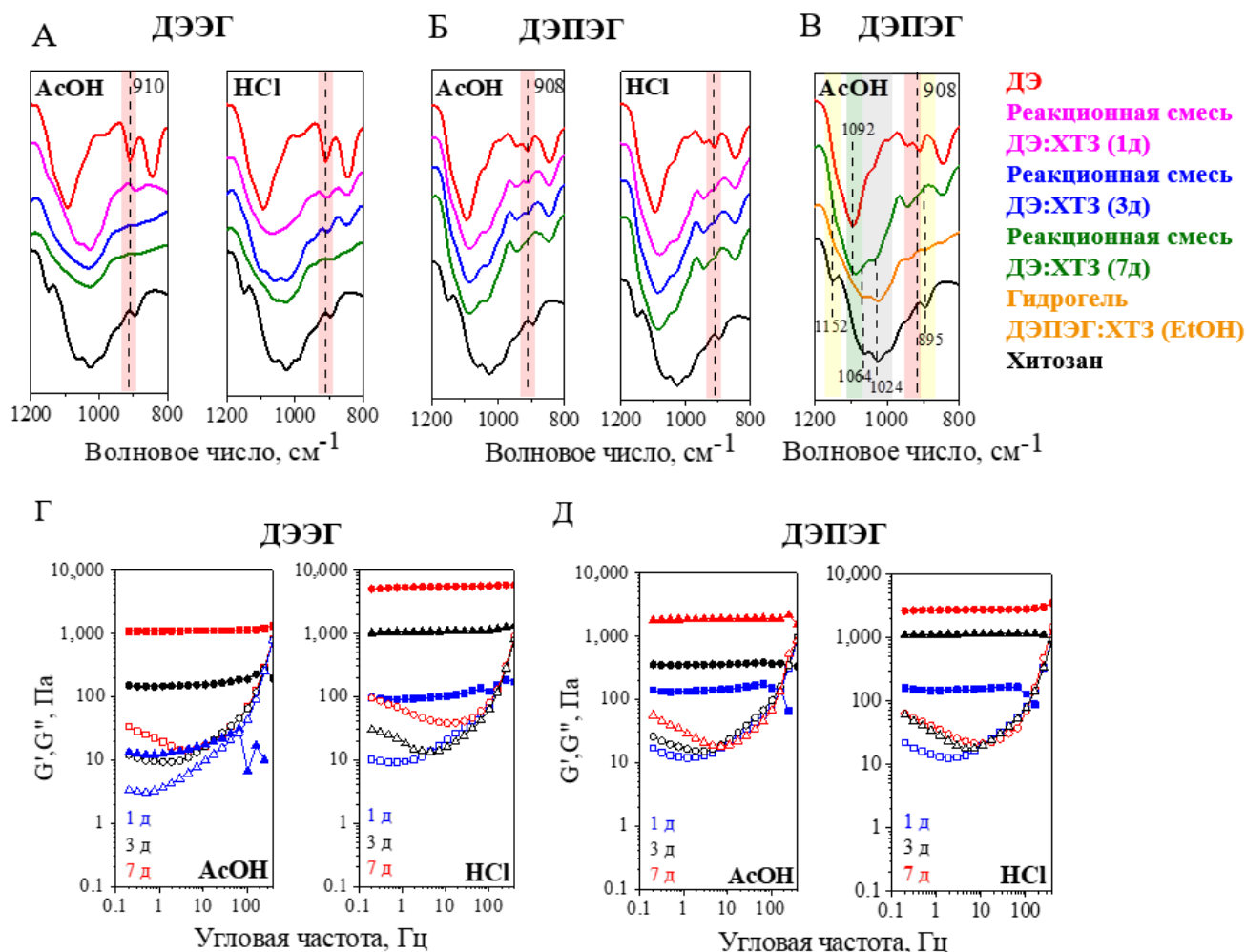


Рисунок 4 – ИК-Фурье спектры реакционных смесей ДЭ:ХТЗ 1:1 в 3%-ных солянокислых (HCl) и уксуснокислых (AcOH) растворах при pH 5.5 через 1, 3, 7 дней после добавления ДЭ (1д, 3д, 7д соответственно): сшивка ДЭЭГ (А) и ДЭПЭГ (Б). ИК-Фурье спектр гидрогеля ДЭПЭГ:ХТЗ (EtOH), полученного из уксуснокислой реакционной смеси (7д) (В). ИК-Фурье спектры ДЭ и хитозана приведены для сравнения. Частотные зависимости модулей накопления (G' , заполненные символы) и потерь (G'' , пустые символы) реакционных смесей через один (1д), три (3д) и семь (7д) дней после добавления ДЭЭГ (Г) и ДЭПЭГ (Д)

Детальный анализ спектров в области $1200\text{--}800\text{ см}^{-1}$ показал (рисунок 4В), что после удаления растворимых реагентов и продуктов реакции при сшивке хитозана ДЭПЭГ в уксуснокислом растворе наблюдается значительное смещение в коротковолновую область полосы, являющейся результатом перекрывания полос, соответствующих связям С–О–С в ДЭ ($1092\text{--}1096\text{ см}^{-1}$) и С–О в хитозане (1064 см^{-1}). Аналогичный эффект наблюдали в спектре криогеля, сшитого ДЭПЭГ, в солянокислом растворе (рисунок 5В), что говорит о снижении степени модификации (СМ) хитозана сшивающим реагентом в этих условиях. Изменения в исследуемой области ($1026\text{--}1094\text{ см}^{-1}$) ИК-спектров гидрогелей и криогелей, сшитых ДЭЭГ и ДЭБД, менее заметны из-за меньшего массового % этих сшивающих реагентов в реакционных

смесях (рисунки 5А и Б). Однако СМ хитозана сшивающими реагентами в условиях криотропного гелеобразования носит нелинейный характер (рисунок 5Г). Максимальные значения СМ среди исследованных ДЭ при всех соотношениях ДЭ:ХТЗ были найдены для ДЭБД. При этом СМ при соотношении ДЭ:ХТЗ 1:1 значительно превышала значение, ожидаемое при стехиометрическом взаимодействии через аминогруппы хитозана. Хотя нельзя исключить возможность реакции ДЭ через гидроксильные группы хитозана (схема 1, структура 6), наиболее вероятным объяснением этого эффекта является образование сеток блок-сополимера за счет олигомеризации ДЭБД в микрофазе, образующейся вследствие наиболее низкой растворимости данного ДЭ в ряду, что коррелирует с наиболее продолжительным временем гелеобразования растворов хитозана в присутствии этого сшивающего реагента (рисунок 1В).

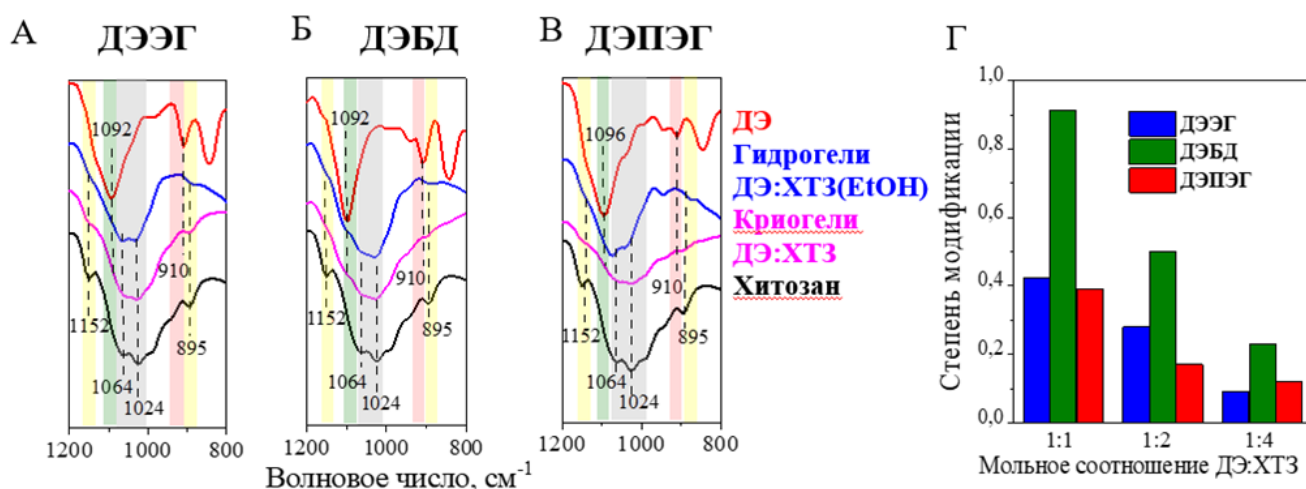


Рисунок 5 – ИК-Фурье спектры криогелей и гидрогелей (ЕtОН) ДЭ:ХТЗ 1:1, полученных из солянокислых растворов хитозана при рН 5.5 сшивкой ДЭЭГ (А), ДЭБД (Б) и ДЭПЭГ (В). Степень модификации криогелей хитозана сшивающими реагентами при различных мольных соотношениях ДЭ:ХТЗ в солянокислых растворах (Г)

В четвертой главе приводятся результаты исследования морфологии, набухания, проницаемости, механических свойств и устойчивости к ферментативному гидролизу криогелей хитозана, полученных сшивкой ДЭ в солянокислых частично замороженных растворах; обсуждаются корреляции между условиями сшивки и свойствами криогелей.

Морфология, набухание и проницаемость криогелей хитозана, сшитых ДЭ

Одним из существенных недостатков ГА как сшивающего реагента для получения криогелей хитозана является высокая скорость сшивки. Быстрое гелеобразование, происходящее в период от нескольких минут до получаса, препятствует росту кристаллов растворителя при охлаждении раствора и в результате формируются поры небольшого размера (как правило, менее 70 мкм). В отличие от ГА менее реакционноспособные ДЭ за счет медленной скорости сшивки (рисунок 6А) обеспечивают формирование криогелей с большим размером пор. При мольном соотношении ДЭ:ХТЗ средний размер пор криогелей был близок к 150 мкм независимо от длины цепи ДЭ, при ДЭ:ХТЗ 1:20 – увеличивался с уменьшением длины цепи ДЭ от 181 ± 60 до 233 ± 57 мкм (рисунок 6Б).

За счёт того, что размер пор криогелей, сшитых ДЭ, в 3–4 раза больше по сравнению с

размером пор криогелей, сшитых ГА, и что он увеличивается с уменьшением степени сшивки (рисунок 6Б), реализуется одно из важнейших преимуществ ДЭ перед ГА в качестве сшивающего реагента для получения криогелей – возможность достижения высокой проницаемости при низкой степени сшивки (рисунок 7А).

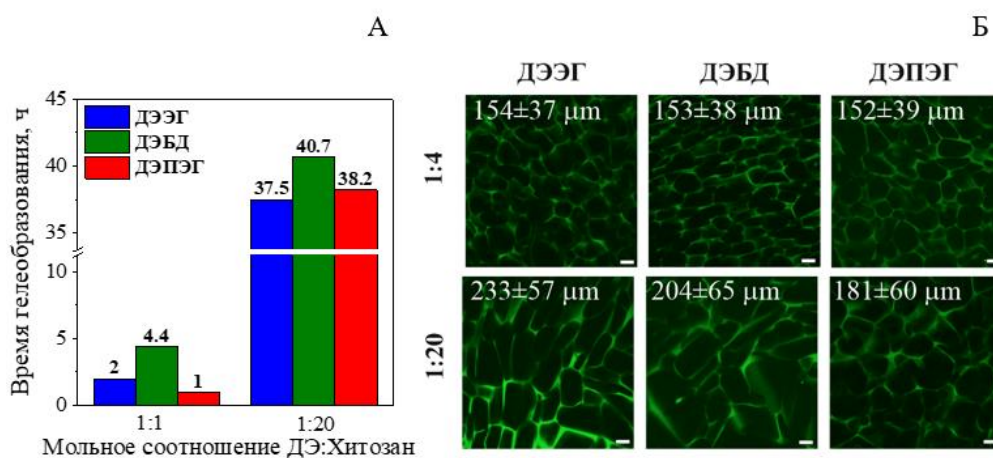


Рисунок 6 – Времена гелеобразования в 3%-ном солянокислом растворе хитозана при мольных соотношениях ДЭ:ХТЗ 1:1 и 1:20, pH 5.5, T= +25 °C (А); изображения поперечных срезов и средние размеры пор криогелей ДЭ:ХТЗ 1:4 и 1:20, полученные методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, масштабная линейка – 100 мкм (Б)

Как отмечалось в литературе, хорошая проницаемость криогелей, сшитых ГА, достигалась только при высоких степенях сшивки, в результате чего параллельно повышалась токсичность материалов, а также снижалось содержание активных функциональных групп⁵. Разница между проницаемостью криогелей, сшитых ГА и ДЭ с разной длиной цепи, помимо отличий в пористой структуре, связана еще с особенностями набухания (рисунок 7Б).

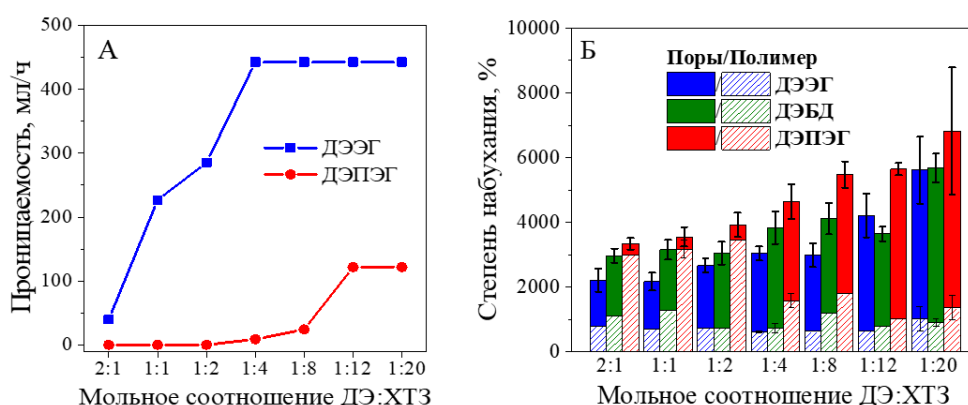


Рисунок 7 – Проницаемость (А) и степень набухания (Б) криогелей хитозана, сшитых ДЭЭГ, ДЭБД и ДЭПЭГ при различных мольных соотношениях ДЭ:ХТЗ

Поскольку ДЭ являются гидрофильными сшивающими агентами, набухание полимерной фазы увеличивается с увеличением степени сшивки и ростом длины цепи за счет гидратации

⁵ Nikonorov V. V., Ivanov R. V., Kil'Deeva N. R., Bulatnikova L. N., Lozinskii V. I. Synthesis and characteristics of cryogels of chitosan crosslinked by glutaric aldehyde // Polym. Sci. - Ser. A. 2010. Vol. 52. No 8. P. 828–834.

сшивок, в результате чего проницаемость криогелей падает. Наиболее высокой проницаемостью в ряду характеризовались криогели, сшитые ДЭЭГ, а низкой – ДЭПЭГ. Степень набухания слабосшитых криогелей хитозана достигала $6823 \pm 1963 \%$ при достаточно хорошей проницаемости (рисунок 7Б).

Механические свойства криогелей хитозана, сшитых ДЭ

Для установления корреляций между длиной цепи ДЭ, степенью сшивки и механическими свойствами полученных криогелей записывали деформационные кривые (напряжение (σ)-деформация (ϵ)) при циклическом одноосном сжатии (рисунок 8Б). На всех кривых четко выделяются три области: 1) линейная область упругих деформаций ($\epsilon = 0-15 \%$) (рисунок 8А-1); 2) область сжатия пор с вытеснением свободной воды из порового пространства ($\epsilon \sim 15-55 \%$) (рисунок 8А-2); 3) область уплотнения стенок пор ($\epsilon > 55 \%$) (рисунок 8А-3). После снятия нагрузки вытесненная из криогеля вода поглощалась криогелем за счет капиллярных сил с восстановлением первоначальной высоты на 90–96 %. Максимальной эластичностью отличались криогели, сшитые ДЭПЭГ, восстанавливающие после снятия нагрузки первоначальную форму на 98–99 %. После набухания в равновесных условиях (избыток воды) восстановление формы было близким к 100 % для всех криогелей.

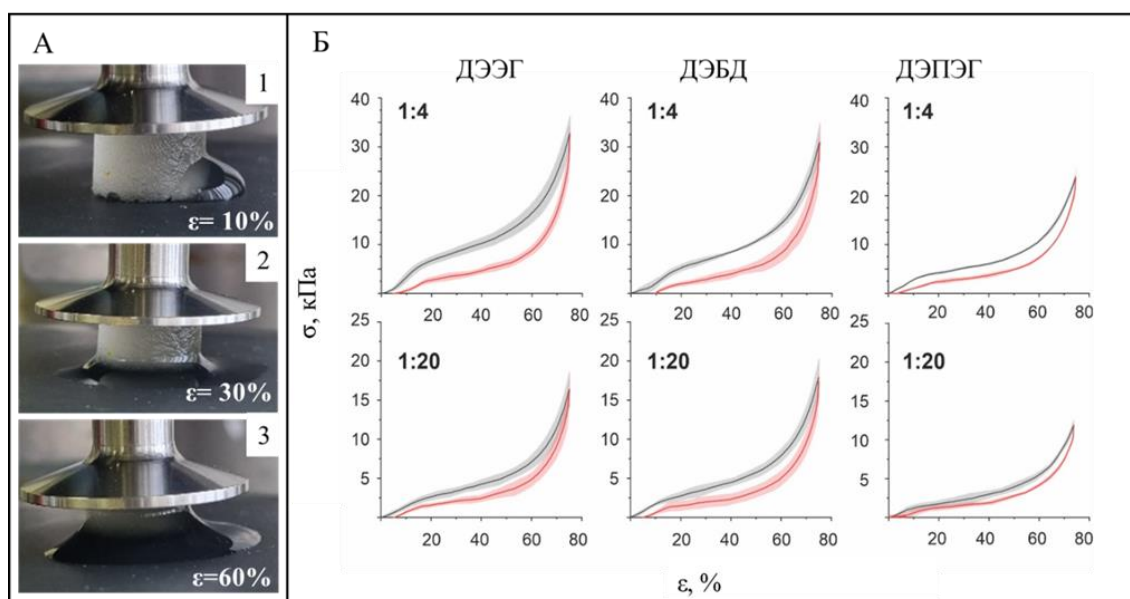


Рисунок 8 – Фотоизображения криогеля ДЭБД:ХТЗ 1:4 в процессе одноосного сжатия (А); деформационные кривые, записанные в цикле «нагрузка-разгрузка» при одноосном сжатии набухших криогелей хитозана ДЭ:ХТЗ 1:4 и 1:20. Заполненные цветом области отражают доверительные интервалы (Б)

Из деформационных кривых рассчитывали удельную потенциальную энергию деформации (U), нагрузку, требующуюся для сжатия криогеля на 40 и 75 % и гистерезис – отношение площади между кривыми в цикле деформации к площади под кривой нагрузки (рисунок 9). Значения всех этих параметров, характеризующих механические свойства криогелей, уменьшались с ростом длины цепи ДЭ и понижением степени сшивки. Таким образом, повышение эластичности криогелей, сшитых ДЭПЭГ, достигалось за счет снижения прочности. Корреляционный анализ с применением коэффициентов Пирсона показал, что

нагрузка при сжатии криогелей хитозана зависит от размера пор, длины цепи сшивающего реагента, но наиболее сильно коррелирует с мольным соотношением ХТЗ:ДЭ ($r = -0.85$) и степенью набухания ($r = -0.89$). Выявленные закономерности позволяют направленно изменять механические свойства криогелей, варьируя их состав.

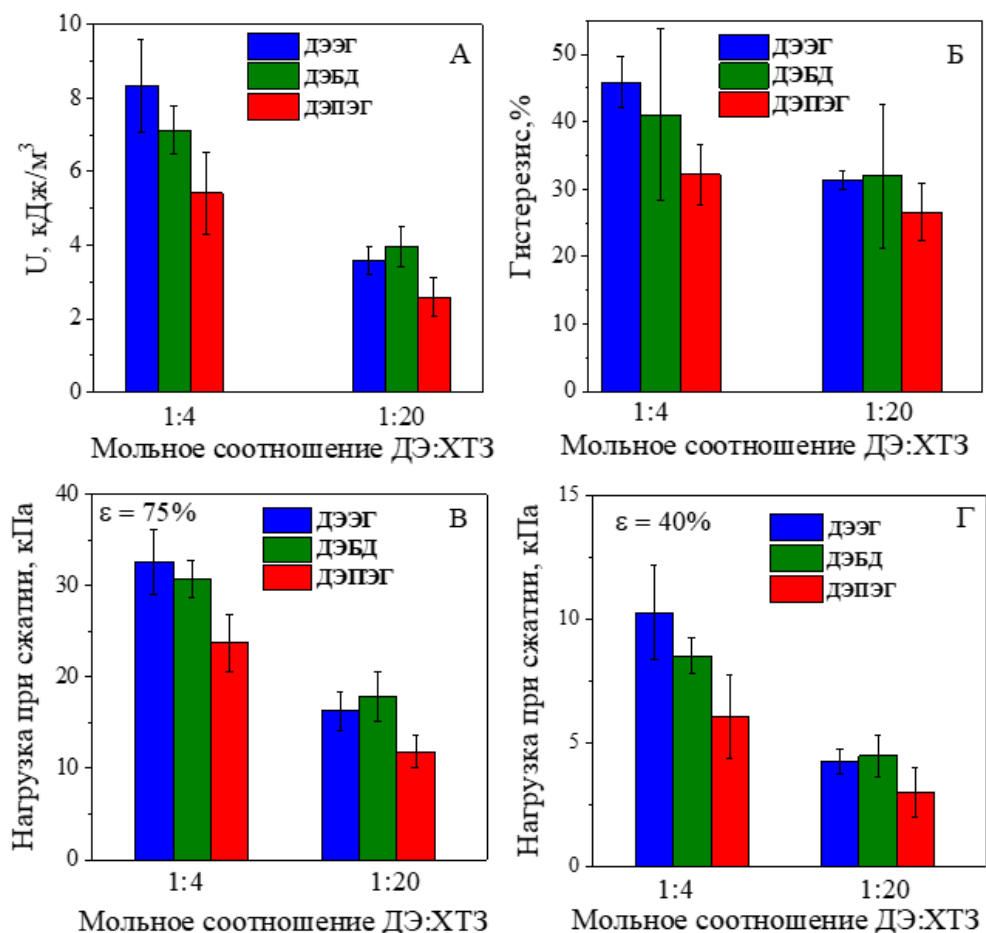


Рисунок 9 – Механические свойства криогелей хитозана ДЭ:ХТЗ 1:4 и 1:20: удельная потенциальная энергия деформации (А), гистерезис (Б) и нагрузка при сжатии криогеля, соответствующая деформации (ϵ) 75 % (В) и 40 % (Г)

Устойчивость криогелей хитозана к ферментативному гидролизу

Для биомедицинского применения большой интерес представляет возможность управления не только механическими свойствами материала, но и скоростью биорезорбции. В результате сшивки меняется как количество доступных для атаки фермента функциональных групп полимера, так и скорость диффузии фермента в полимерной матрице. Устойчивость полученных криогелей хитозана к ферментативной деградации исследовали в присутствии специфического фермента β -глюканазы. Глубина гидролиза в ряду сшивающих реагентов, оцениваемая по потере массы криогеля, увеличивалась (рисунок 10А) с увеличением степени набухания (рисунок 7Б) и снижением максимальной нагрузки при деформации (рисунок 9В). Максимальная потеря массы (более 95 %) за 24 часа наблюдалась для наиболее мягкого и эластичного криогеля, сшитого ДЭПЭГ при мольном соотношении ДЭ:ХТЗ 1:20 (рисунок 10А). Исследование зависимости скорости ферментативной деградации для криогелей, сшитых ДЭПЭГ, от мольного соотношения ДЭ:ХТЗ показало (рисунок 10Б), что константа скорости

деградации, рассчитанная по кинетическому уравнению псевдопервого порядка, снизилась в 612 раз при увеличении концентрации ДЭ в 20 раз (рисунок 10В), что делает устойчивость к ферментативному гидролизу параметром, наиболее чувствительным к условиям сшивки.

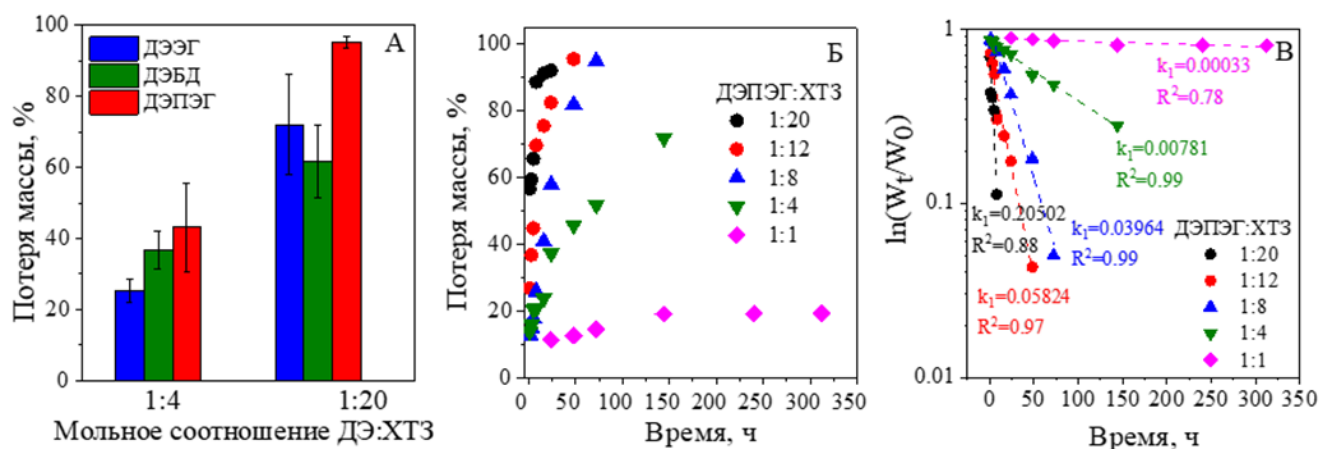


Рисунок 10 – Ферментативный гидролиз криогелей ДЭ:ХТЗ β -глюканазой (330 ед/мл, pH 7.4, $T = +37^\circ\text{C}$): потеря массы (глубина гидролиза) за 24 ч (А); кинетические кривые ферментативной деградации криогелей ДЭПЭГ:ХТЗ (Б), они же после преобразования в линейную форму по уравнению кинетики псевдопервого порядка для расчета констант скорости ферментативной деградации (В)

В пятой главе рассмотрены некоторые потенциальные области применения криогелей хитозана, приведены результаты экспериментального обоснования критериев выбора ДЭ и степени сшивки для получения на основе криогелей сорбентов и носителей катализаторов; результаты исследования цитотоксичности и биосовместимости криогелей хитозана для 3D культивирования клеток и регенеративной медицины.

Сорбционные свойства монолитных криогелей хитозана

Благодаря наличию первичных аминогрупп хитозан является высокоэффективным сорбентом, как для ионов металлов, так и для анионных органических веществ, в том числе, красителей. На примере сорбции красителя ализаринового красного (АК) был оптимизирован состав криогеля для применения в качестве монолитного сорбента. Исходя из установленных зависимостей между характеристиками криогелей и условиями сшивки (глава 4), в качестве сшивающего реагента был выбран ДЭЭГ – сшивающий агент с самой короткой длиной цепи. Эффективность извлечения АК 95–97 % была постоянной в диапазоне pH 2–8 при концентрации АК = 500 мг/л и Т:Ж 1:1000. С учетом того, что монолитный материал для сорбции в динамических условиях должен сочетать высокую сорбционную емкость с хорошей проницаемостью и достаточной механической прочностью, а также сохранять постоянный объем при сорбции в динамических условиях, оптимальное соотношение ДЭЭГ:ХТЗ составило 1:4 (рисунок 11). Хотя криогели с меньшей степенью сшивки имеют хорошую проницаемость и более высокую сорбционную емкость (рисунок 11А), их объем резко уменьшается в процессе сорбции (рисунок 11Б). Статическая сорбционная емкость криогеля ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 по отношению к красителю АК составила 803 мг/г. Несмотря на то, что эффективная динамическая сорбционная емкость была ниже статической (рисунок 11В), достигнутое значение в 280 мг/г выше, чем сорбционная емкость материалов, описанных в литературе.

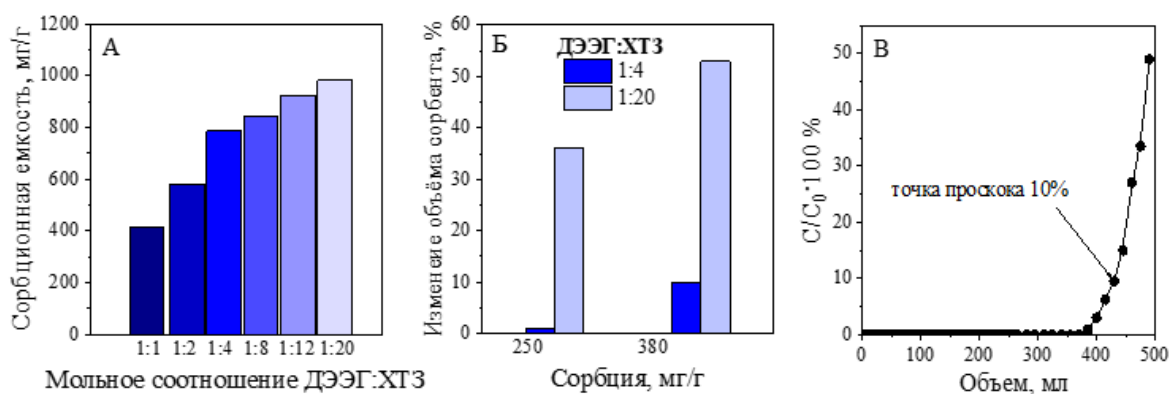


Рисунок 11 – Сорбционная емкость криогелей ДЭЭГ:ХТЗ по красителю АК (А) при следующих условиях сорбции: исходная концентрация АК – 1000 мг/л, Т:Ж – 1:1000, рН = 5.6, время контакта – 24 ч; изменение (уменьшение) объема криогелей ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 и 1:20 после сорбции красителя АК в количестве 250 и 380 мг/г (Б); выходная кривая сорбции АК на монолитном криогеле ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 (внутренний диаметр колонки – 0.48 см, высота слоя – 6 см), концентрация АК – 20 мг/л, скорость потока – 20 к.о./ч, рН = 5.6 (В)

Применение криогелей хитозана в качестве носителей катализаторов

Аналогичный принцип, учитывающий механические свойства и проницаемость криогеля в зависимости от состава, был применен и для выбора криогелей хитозана в качестве носителя катализатора. Исследования скорости модельной реакции восстановления нитрофенола проводили на дисках криогелей, сшитых ДЭЭГ, ДЭБД и ДЭПЭГ при ДЭ:ХТЗ 1:4, с нанесенными путем *in situ* восстановления адсорбированных ионов Pd(II) наночастицами палладия. Из рассчитанных из кинетических кривых (рисунок 12А) по уравнению псевдопервого порядка констант скоростей реакции (рисунок 12Б) можно сделать вывод, что эффективность композитного катализатора уменьшается в ряду криогелей-носителей ДЭЭГ:ХТЗ > ДЭБД:ХТЗ > ДЭПЭГ:ХТЗ. Этот ряд соответствует увеличению степени набухания криогелей, в том числе, в значительной степени за счет повышения степени набухания полимерной фазы в случае криогеля ДЭПЭГ:ХТЗ. В результате утолщения стенок пор криогелей и уменьшения просвета пор скорость конверсии снижается в ряду полученных материалов более чем в 4 раза при постоянном содержании палладия.

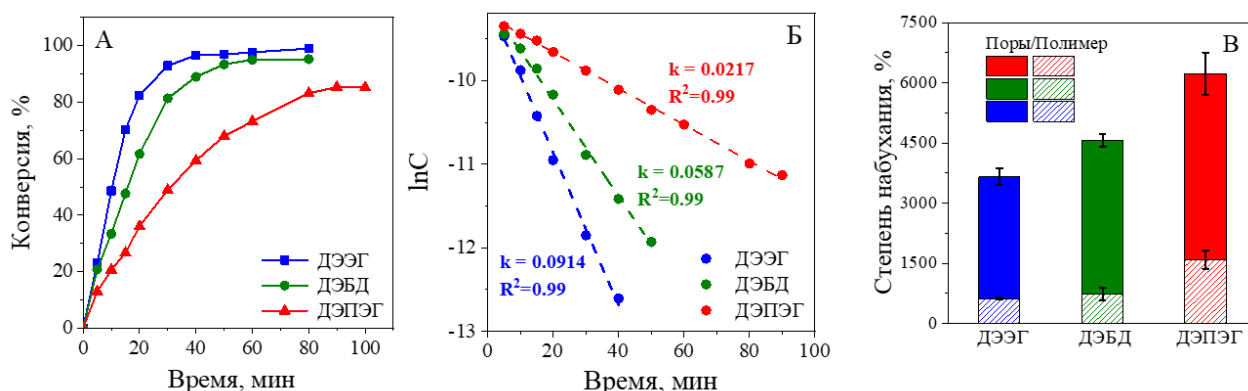


Рисунок 12 – Кинетические кривые конверсии пара-нитрофенола в реакции с боргидридом натрия на катализаторах ДЭ:ХТЗ 1:4-наночастицы Pd(0), содержание Pd – 1.5 массовых % (А), они же после преобразования в линейную форму по уравнению кинетики псевдопервого порядка для расчета констант скорости реакции (Б); степень набухания криогелей ДЭ:ХТЗ 1:4 в воде (В)

Цитосовместимость криогелей хитозана и применение для 3D культивирования клеток

Для исследования цитотоксичности полученных криогелей хитозана и их применимости в качестве скаффолдов для 3D-культивирования клеток была выбрана постоянная линия клеток карциномы прямой кишки человека (НСТ 116) и криогели, значительно отличающиеся по своим морфологическим и механическим характеристикам – ДЭБД: ХТЗ 1:4 и ДЭПЭГ : ХТЗ 1:12.

Через 24 ч культивирования клеток со сшивающими реагентами ДЭБД и ДЭПЭГ в концентрациях, соответствующих условиям получения криогелей, по данным проточной цитометрии наблюдали гибель 89 и 55 % клеток соответственно (рисунок 13А), что подтверждает достаточно высокую цитотоксичность ДЭ. Однако поскольку в процессе сшивки хитозана ответственные за цитотоксичность ДЭ эпоксигруппы раскрываются и участвуют в образовании новых устойчивых связей, полученные криогели демонстрируют высокую цитосовместимость: на 7-е сутки культивирования жизнеспособность клеток в обоих криогелях была выше 60 % (рисунок 13Б).

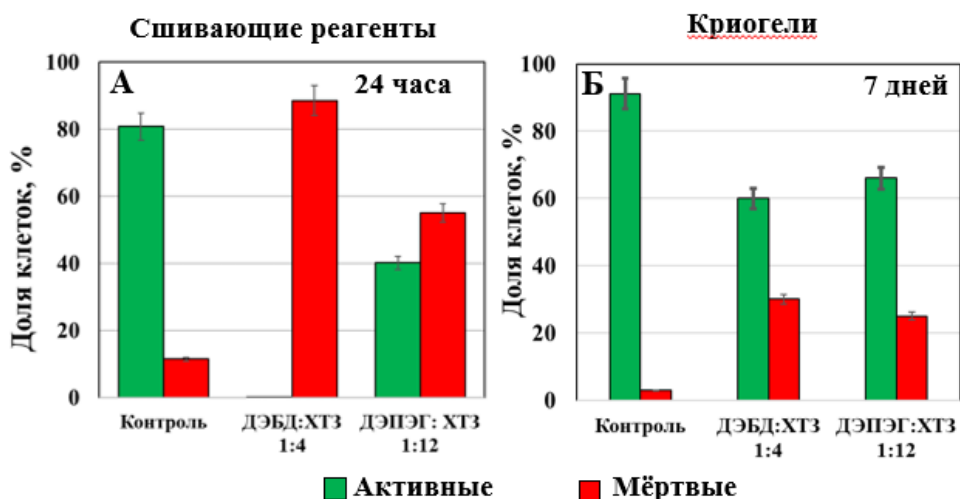


Рисунок 13 – Жизнеспособность клеток карциномы прямой кишки человека (НСТ 116) в присутствии сшивающих реагентов ДЭБД и ДЭПЭГ через 24 ч культивирования (А) и криогелей ДЭБД:ХТЗ 1:4 и ДЭПЭГ:ХТЗ 1:12 через 7 дней культивирования (Б). Концентрация свободных ДЭ (А) соответствовала содержанию ДЭ в криогелях (Б)

3D культивирование линии НСТ 116 проводили в течение 14 суток (исследования выполнены в ННЦМБ ДВО РАН). В более мягких криогелях ДЭПЭГ:ХТЗ 1:12 уже на третьи сутки формировались компактные клеточные сфероиды, размер которых постепенно увеличивался и к 14-ым суткам превышает 100 мкм (рисунок 14). Несмотря на то, что доля мертвых клеток увеличивалась с увеличением времени культивирования, экспоненциальный рост плотности клеток свидетельствует о сохранении их высокой пролиферативной активности. Снижение жизнеспособности, вероятно, наблюдается вследствие перенаселения криогеля и ограничения доступа питательных веществ к клеткам. В более жестком криогеле ДЭБД:ХТЗ 1:4 морфология клеточных агрегатов отличается в сторону большего преобладания контактов клеток с полимерной матрицей, в результате чего агрегаты представляют собой рыхлые структуры, в большей степени распластывающиеся по стенкам пор. Таким образом, можно сделать выводы, что полученные криогели хитозана с разной степенью сшивки цитосовместимы, пригодны для длительного 3D культивирования клеток, а морфология формирующихся клеточных агрегатов зависит от характеристик криогелей.

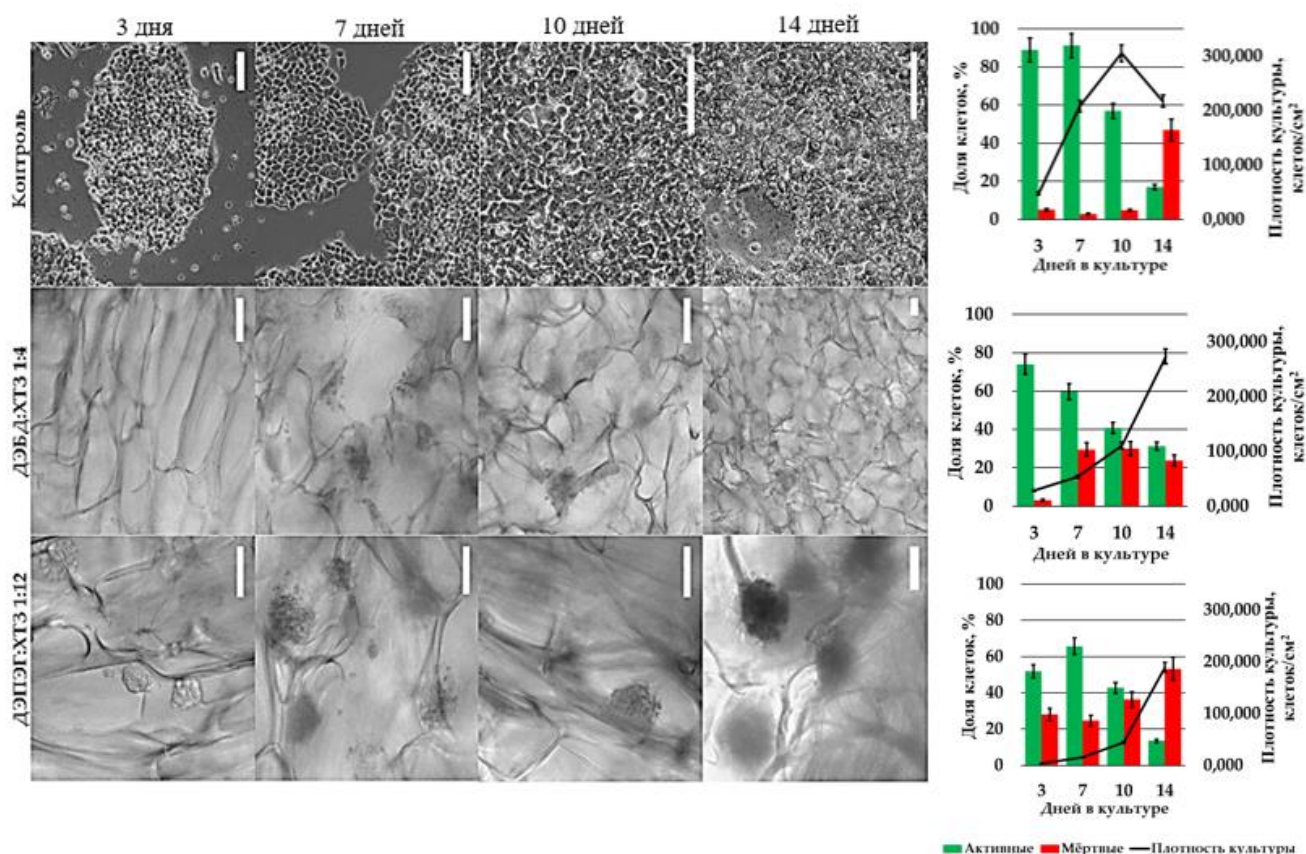


Рисунок 14 – Общий вид клеточных структур НСТ 116 и функциональная активность и плотность клеток НСТ 116 через 3, 7, 10, 14 дней культивирования в 2D (адгезионный планшет) и 3D (криогели ДЭБД:ХТЗ 1:4 и ДЭПЭГ:ХТЗ 1:12) условиях, масштабная линейка – 100 мкм

Биосовместимость криогелей исследовали на животной модели (мыши) при имплантации в бедренную мышцу диска криогеля ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 (работы проведены в ИОС УрО РАН). Через 14 дней проводили гистологические исследования тканей, окружающих имплантат (рисунок 15).

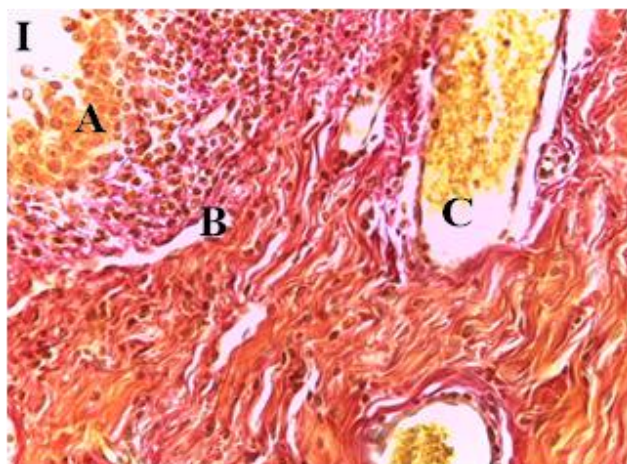


Рисунок 15 – Микрофотография гистологического препарата границы между живой тканью и имплантатом: I – имплантат; А – участок лейкоцитарной реакции; В – участок молодой соединительной ткани с коллагенизацией; С – кровеносный сосуд (×400)

Не было выявлено достоверных различий в морфологии тканей и репаративных процессах в окружающих и прилежащих к имплантату тканях по сравнению с контролем. У всех экспериментальных животных умеренная воспалительная реакция вокруг имплантатов

сопровождалась формированием нормальной грануляционной ткани. Вокруг имплантата (рисунок 15, область I) наблюдалась умеренная лейкоцитарная реакция (рисунок 15, область A) и образование соединительной ткани (рисунок 15, область B). Отсутствовали также изменения в печени и селезенке, которые могли бы быть вызванными низкомолекулярными продуктами деградации имплантата. Полученные результаты доказывают высокую биосовместимость криогелей и возможность их применения в регенеративной хирургии.

ВЫВОДЫ

1. Впервые изучены особенности гелеобразования в солянокислых и уксуснокислых растворах хитозана в присутствии диглицидиловых эфиров (ДЭ). Установлено, что время гелеобразования резко снижается при $\text{pH} > 4.5$, а причиной низкой эффективности сшивки хитозана в уксуснокислых растворах является расход ДЭ на побочную реакцию образования сложного эфира уксусной кислоты. Впервые доказана возможность использования диглицидиловых эфиров этиленгликоля (ДЭЭГ), 1,4-бутандиола (ДЭБД) и (поли)этиленгликоля (ДЭПЭГ) для сшивки хитозана в частично замороженных растворах с получением криогелей с настраиваемой пористой структурой и свойствами. Проницаемые криогели с размером пор от 154 ± 37 до 233 ± 57 мкм были получены при температуре -10°C и времени сшивки 12 суток из 3 %-ных солянокислых растворов хитозана при $\text{pH} 5.5$ в диапазоне мольных соотношений ДЭ:ХТЗ 1:4–1:20.
2. Установлено, что общая степень набухания, проницаемость и эластичность криогелей хитозана, сшитых ДЭ, растут с понижением степени сшивки. При этом с ростом длины цепи ДЭ степень набухания и эластичность увеличиваются, а проницаемость падает. Удельная потенциальная энергия деформации, нагрузка при деформации и величина гистерезиса в цикле одноосного сжатия снижаются с увеличением длины цепи ДЭ и уменьшением степени сшивки криогелей. Наиболее чувствительным к условиям сшивки параметром является устойчивость криогелей к ферментативной деградации. Для криогелей, сшитых ДЭПЭГ, скорость ферментативной деградации под действием β -глюканазы снижается в 612 раз при изменении мольного соотношения ДЭПЭГ:ХТЗ от 1:20 до 1:1.
3. Показано, что оптимальное соотношение проницаемости, механических и сорбционных свойств для применения криогелей в монолитных сорбционных колонках достигается при сшивке хитозана ДЭЭГ при мольном отношении ДЭ: хитозан 1:4. Полная статическая сорбционная емкость такого криогеля по отношению к красителю ализариновому красному составила 803 мг/г, эффективная динамическая сорбционная емкость – 280 мг/г.
4. Показано, что скорость реакции каталитического восстановления нитрофенола на криогелях хитозана с нанесенными наночастицами палладия снижается в ряду сшивающих реагентов ДЭЭГ > ДЭБД > ДЭПЭГ, что коррелирует с увеличением степени набухания полимерной фазы и снижением проницаемости криогелей.
5. Впервые установлено, что криогели хитозана, сшитые ДЭ, характеризуются высокой цитосовместимостью и пригодны для длительного 3D культивирования клеток человека. При этом морфология формирующихся клеточных агрегатов зависит от характеристик криогелей. Высокая биосовместимость криогеля хитозана, сшитого ДЭЭГ, доказана в эксперименте *in vivo* на животной модели (мышь).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ИЗЛОЖЕНО В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Privar Y., Modin E., Bratskaya S. Removal of alizarin red by supermacroporous cross-linked chitosan monolith sorbents // Prog. Chem. Appl. Chitin its Deriv. 2019. Vol. 24. P. 164–171.
2. Privar Y., Kodess M., Modin E., Nesterov D., Pestov A., Slobodyuk A., Marinin D., Bratskaya S. Chitosan gels and cryogels cross-linked with diglycidyl ethers of ethylene glycol and polyethylene glycol in acidic media // Biomacromol. 2019. Vol. 20. P. 1635–1643.
3. Privar Y., Boroda A., Pestov A., Kazantsev D., Malyshev D., Skatova A., Bratskaya S. Chitosan cryogels cross-linked with 1,1,3-triglycidyl oxopropane: mechanical properties and cytotoxicity for cancer cell 3D cultures // Biomimetics. 2023. Vol. 2. P. 228.
4. Privar Y., Skatova A., Maiorova M., Golikov A., Boroda A., Bratskaya S. Tuning mechanical properties, swelling, and enzymatic degradation of chitosan cryogels using diglycidyl ethers of glycols with different chain length as cross-linkers // Gels. 2024. Vol. 10. No 7. P. 483.
5. Privar Yu., Skatova A., Golikov A., Bratskaya S. Gelation and cryogelation of chitosan: origin of low efficiency of diglycidyl ethers as cross-linkers in acetic acid solutions // Polysaccharides. 2024. Vol. 5. P. 731-742.

Публикации в сборниках и материалах конференций:

1. Привар Ю.О., Борода А.В., Майорова М.А., Скатова А.В., Братская С.Ю. Криогели хитозана и карбоксиалкилхитозана, сшитые диглицидиловыми эфирами гликолей для трёхмерного культивирования клеток // XII научная сессия-конкурс молодых учёных ИХ ДВО РАН, посвященная 50-летию Института химии ДВО РАН: сборник материалов. Владивосток: Изд-во Дальневосточного федерального университета, 2021. С. 74.
2. Привар Ю.О., Скатова А.В., Борода А.В., Братская С.Ю. Особенности физико-химических характеристик ковалентно сшитых супермакропористых криогелей хитозана и карбоксиметилхитозана // Шестнадцатая Всероссийская конференция с международным участием «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана»: Материалы конференции. Владивосток. Изд-во Дальневосточного федерального университета, 2023. С. 137. ISBN 978-5-7444-5553-8.
3. Привар Ю.О., Скатова А.В., Борода А.В., Братская С.Ю. Получение и физико-химические характеристики ковалентно сшитых супермакропористых криогелей хитозана и карбоксиметилхитозана // III Зезинская школа-конференция для молодых учёных "Химия и физика полимеров": сборник тезисов. Москва, 2023. С. 38.
4. Привар Ю.О., Братская С.Ю. Особенности гелеобразования и физико-химические характеристики гидрогелей хитозана, полученных сшивкой диглицидиловыми эфирами гликолей в солянокислых и уксуснокислых растворах // XIII научная сессия-конкурс молодых учёных ИХ ДВО РАН, посвященная 300-летию Российской академии наук. Сборник научных трудов. Владивосток. Изд-во Владивостокского государственного университета, 2024. С. 68. ISBN 978-5-9736-0723-4.
5. Привар Ю.О., Борода А.В., Майорова М.А., Скатова А.В., Голиков А.П., Малышев Д.Д., Братская С.Ю. Факторный анализ в дизайне хитозановых скаффолдов для 3D культивирования клеток // XXII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: Сборник тезисов докладов в 7 томах. Сочи, 2024. Т. 3. С.132. ISBN 978-5-00202-667-8

Патент

Пат. № 2699562 Российская Федерация, МПК C08L 5/08 (2006.01), C08B 37/08 (2006.01), C08J 9/28 (2006.01), A61K 31/722 (2006.01), A61P 41/00 (2006.01). Способ получения пористых материалов на основе хитозана / С.Ю. Братская, Ю.О. Привар, Д.В. Нестеров, А.В. Пестов

Привар Юлия Олеговна
КРИОГЕЛИ ХИТОЗАНА, СШИТЫЕ ДИГЛИЦИДИЛОВЫМИ ЭФИРАМИ:
СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Подписано в печать.....Формат 60 x 84/16.
Усл. п. л. 1,4. Уч.-изд. л. 1,35. Тираж 100 экз. Заказ.....