

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

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

На правах рукописи



РУМЯНЦЕВА ВИКТОРИЯ ОЛЕГОВНА

**СИНТЕЗ 3D-СТРУКТУР НА ОСНОВЕ ТРЕСКОВОГО КОЛЛАГЕНА В
УСЛОВИЯХ ГЕТЕРОГЕННОГО ФОТОКАТАЛИЗА В ПРИСУТСТВИИ
СЛОЖНЫХ ОКСИДОВ МЕТАЛЛОВ**

1.4.7. Высокомолекулярные соединения

Диссертация на соискание
ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, доцент
Семеньчева Людмила Леонидовна

Нижний Новгород - 2026

Содержание

Список сокращений	5
Введение.....	7
Глава 1. Литературный обзор.....	13
1.1. Получение новых материалов на основе природных полимеров приемами радикального инициирования.....	13
1.1.1. Радикальная привитая сополимеризация как способ получения современных материалов для медицины.....	13
1.1.2. Контролируемая радикальная полимеризация и ее возможности в получении новых материалов для медицины на основе природных полимеров	17
1.2. Особенности природы белковых природных соединений	21
1.2.1. Методы модификации природных белков	22
1.2.2. Особенности рыбного и животного коллагена/желатина	25
1.3. Гидрогелевые материалы на основе белков: особенности, получение и применение	29
1.4. Ферментативное разрушение и биodeградируемость белков и материалов на их основе	38
1.5. Гетерогенный фотокатализ в синтезе полимерных материалов.....	42
Глава 2. Экспериментальная часть.....	51
2.1. Материалы и реактивы	51
2.2. Выделение высокомолекулярного трескового коллагена/желатина и их характеристика	51
2.3. Синтез сложных оксидов – фотокатализаторов	52
2.4. Полимеризация MMA в воде в условиях гетерогенного фотокатализа	54
2.5. Синтез привитых сополимеров на основе коллагена/желатина в условиях гетерогенного фотокатализа.....	54

2.6. Подготовка образцов к проведению анализов	56
2.7. Инструментальные методы исследования	57
2.8. Методы исследования биомедицинских характеристик.....	60
ГЛАВА 3. Результаты и их обсуждение	70
3.1. Теоретическое обоснование концепции получения трехмерных структур на основе природных и синтетических полимеров в присутствии сложных оксидов.....	71
3.1.1. Синтез привитых сополимеров метилметакрилата на тресковый коллаген в условиях гетерогенного фотокатализа в присутствии сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$	75
3.1.2. Побочные реакции при фотокатализе в водной дисперсии с коллагеном в присутствии сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$	79
3.1.3. Модификация сополимера коллаген–ПММА для получения гидрогеля.....	85
3.1.4. Влияние природы сложного оксида металлов на продукты фотокатализа реакций метилметакрилата и трескового коллагена в водной дисперсии	94
3.1.5. Контроль изменений поверхности сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ методом РФЭС после катализа полимеризации	103
3.2. Ферментативный катализ в биоразрушении белковых структур	112
3.2.1. Особенности ферментативного гидролиза трескового коллагена разными протеолитическими ферментами	112
3.2.2. Ферментативный гидролиз привитых сополимеров	118
3.3. Рыбный желатин как альтернатива рыбного коллагена в гибридных материалах для регенеративной медицины.....	120
3.3.1. Сравнение характеристик трескового коллагена и желатина.....	121

3.3.2. Синтез привитого сополимера желатин-ПММА в присутствии сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$	124
3.4. Биосовместимость новых гидрогелей на основе трескового коллагена	126
3.4.1. Предварительные испытания гидрогелей на основе сополимера коллаген-ПММА	126
3.4.2. Влияние наночастиц катализатора на грибостойкость полимерных материалов на основе сополимера коллаген-ПММА	130
3.4.3. Оценка цитотоксичности образцов на основе сополимера коллаген-ПММА с помощью МТТ-теста	132
3.4.4. Оценка эффективности и безопасности покрытия на основе сополимера коллаген-ПММА для заживления ожоговых ран на крысах	137
Заключение	143
Список литературы	146
Приложение 1	189
Приложение 2	190
Приложение 3	191
Благодарности.....	192

Список сокращений

- АК – акриловая кислота
- АФК – активные формы кислорода
- ВКМ – Внеклеточный матрикс
- ГА – глутаровый альдегид
- ГПХ – гель-проникающая хроматография
- ДАК – динитрил азобисизомасляной кислоты
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДФЧ – дермальные фибробласты человека
- ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия
- ЛК – лимонная кислота
- МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
- ММА – метилметакрилат
- ММ – молекулярная масса
- ММР – молекулярно-массовое распределение
- МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия бромида
- ОИР – относительная интенсивность роста
- ОММА – продукт окислительной димеризации ММА
- ОП – оптическая плотность
- ПГХ – пиролитическая газовая хроматография
- ПМ – показатель микроциркуляции
- ПММА – полиметилметакрилат
- ПОММА – полимер окисленного метилметакрилата
- ПШ – показатель шунтирования
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- РМА – рентгеновский микрозондовый анализ
- РФЭС – рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
- ТГМ-3 – диметакрилат триэтиленгликоля
- ТГФ – тетрагидрофуран

ТЖ – тресковый желатин

ТК – тресковый коллаген

ТЭС – телячья эмбриональная сыворотка

УЗ – ультразвук

УЗДН – ультразвуковой диспергатор низкочастотный

ЭГ – этиленгликоль

ATRP – радикальная полимеризация с переносом атомов (Atom Transfer Radical Polymerization)

DMEM – среда «Игла» в модификации Дульбекко

RAFT – обратимая полимеризация с переносом цепи по механизму присоединения-фрагментации (Reversible Addition Fragmentation chain Transfer)

RDRP – радикальная полимеризация с обратимой дезактивацией (Reversible-Deactivation Radical Polymerization)

SFRP – полимеризация, основанная на реакциях обратимой диссоциации-рекомбинации, протекающих с участием стабильных радикалов (Stable Free Radical Polymerization)

Введение

Актуальность темы исследования. Насущные проблемы современной медицины привели к возникновению новой области полимерной науки – химии биомедицинских полимеров, основным направлением которой является получение материалов для фармацевтической и биотехнологической промышленности. Такие материалы находят применение в различных составах для заживления ран любой этиологии, тканевой инженерии, а новые подходы к получению таких продуктов делают разработки важным инструментом в выборе нужных направлений управления процессом выздоровления человека. Известные доступные природные полимерные материалы, особенно белки, довольно широко исследованы в этом плане и представлены в литературе. Основной причиной непригодности использования только белков в ранозаживляющих покрытиях является отсутствие устойчивой трехмерной структуры и связанных с ней параметров – прочности, долговечности, а также гидрофильно-гидрофобного баланса. Проблема все чаще решается путем введения модифицирующих добавок или получения гибридных материалов с включением биосовместимых полимерных фрагментов. В этом случае прививка полимеров с помощью активаторов стала одним из часто применяемых подходов. В последнее время при радикальном иницировании предпочтение имеют энергоэффективные способы, в частности, фотокатализ в области видимого света, для снижения химического загрязнения в рамках «зеленой химии». В то же время рыбный коллаген стал предметом изучения в области медицинских материалов благодаря замечательной биосовместимости и содержанию ценных биоактивных компонентов. В связи с этим синтез трехмерных структур на основе трескового коллагена (ТК), полученных в условиях гетерогенного фотокатализа в области видимого света в присутствии сложных оксидов металлов, является своевременным и актуальным.

Степень разработанности темы исследования. Использование гетерогенного фотокатализа в условиях мягкого облучения – это тренд «зеленой химии», более всего работ связано с очисткой воды и воздуха от загрязнителей, разложением органических отходов. $\text{HO}\bullet$ -радикалы в этом случае являются основным инструментом гетерогенного фотокатализа. В области получения полимерных материалов более всего известны исследования по фотокатализу в условиях контролируемой радикальной полимеризации ATRP и RAFT. В то же время привитая сополимеризация с помощью различных активаторов стала одним из часто применяемых подходов при получении полимерных продуктов.

Целью работы является синтез трехмерных структур с использованием гетерогенного фотокатализа в присутствии сложных оксидов металлов под действием видимого света в водной дисперсии для радикального инициирования привитой сополимеризации метилметакрилата (ММА) на ТК при варьировании состава исходной реакционной смеси путем введения известных модифицирующих добавок, а также исследование биоразрушения коллагена и сополимеров на его основе и испытание биосовместимости новых гидрогелей.

Достижение поставленной цели требовало решения следующих **задач**:

1. Установление условий получения и физико-химических характеристик привитого сополимера ТК–полиметилметакрилат (ПММА), а также исследование побочных реакций с участием ММА в условиях фотокатализа при облучении видимым светом в присутствии ряда сложных оксидов, более всего на примере сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$;
2. Выяснение влияния модифицирующих добавок (полиэтиленгликоля (ПЭГ), диметакрилата триэтиленгликоля (ТГМ-3), акриловой кислоты (АК) и глутарового альдегида (ГА)) на процесс формирования устойчивых 3D-структур на основе сополимера ТК–ПММА с участием оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$;
3. Изучение поверхности сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ после катализа полимеризации и условий его регенерации;

4. Анализ особенностей гидролиза ТК разными протеолитическими ферментами при разном фермент-субстратном соотношении, а также сополимеров на его основе;
5. Сравнение трескового желатина (ТЖ) и ТК как компонентов разработанных гибридных материалов по ряду характеристик;
6. Предварительные испытания гидрогелей на основе ТК на некоторые биомедицинские характеристики: устойчивость, влагопоглощение, цитотоксичность, грибостойкость, эффективность в репарации ожоговых ран.

Научная новизна работы. Впервые для инициирования радикальных процессов при получении привитых сополимеров акрилатов на ТК/ТЖ, а также устойчивых полимерных 3D-структур на их основе с включением модификаторов и сшивающих агентов, использован фотокатализ при облучении видимым светом сложных оксидов, более всего $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, в водной дисперсии и инертной атмосфере с целью получения активного гидроксильного радикала.

Теоретическая значимость работы. Результаты исследований имеют важное значение, т.к. являются развитием представлений о возможности стратегии радикальных реакций в мономерно-полимерной среде в условиях фотокатализа в присутствии сложных оксидов. Показана возможность получения в одну стадию 3D-структур, гидрогелей на основе ТК путем фотокатализа при облучении видимым светом сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, что соответствует принципам «зеленой химии». Дальнейшее развитие метода «зеленой химии» как жизнеспособной «более экологичной» альтернативы методам, использующим высокие температуры и давление, является актуальным и востребованным.

Практическая значимость работы состоит в том, что гидрогели на основе ТК имеют перспективу применения в качестве клеточных матриц в тканевой инженерии при повреждении органов или тканей, а также в качестве раневых покрытий повреждений кожи любой этиологии. ТК превосходит по всем показателям животный коллаген. Уникальность новых

покрытий также связана с антигрибковыми свойствами, позволяющими их использование в нестерильных условиях.

Методология и методы исследования. Работа выполнена при использовании комплексного подхода к решению задач, поставленных целью. Суть такого подхода – логичное сочетание методов синтеза полимеров с современными методами физико-химического анализа. Объектами исследования явились ТК/ТЖ, ММА, ПЭГ, АК, ТГМ-3 и ГА, полимеры и привитые сополимеры с включением перечисленных компонентов, сложные оксиды разной природы на основе металлов Na, K, Cs, Rb, Bi, V, Mo, Te, Ni, W, Mn, Co, Cu, Nb, протеолитические ферменты: панкреатин, трипсин, тромбин. Исходные вещества и продукты синтеза изучены с помощью методов ИК- и ЯМР-спектроскопии, рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС), масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ), гель-проникающей хроматографии (ГПХ), пиролитической газовой хроматографии (ПГХ), сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), CHNS-элементного анализа, рентгеновского микронзондового анализа (РМА). Применялись релевантные методы анализа структурной устойчивости, влагопоглощения и грибостойкости гидрогелей. Цитотоксичность исследовали методом МТТ-теста *in vitro* на клеточных культурах дермальных фибробластов человека (ДФЧ). Исследование эффективности гидрогелей в репарации ожоговых ран проводили на крысах.

Положения, выносимые на защиту:

- реакционные условия синтеза привитого сополимера ТК/ТЖ–ПММА и гидрогелей на их основе в условиях фотокатализа в водной дисперсии в присутствии сложных оксидов, более всего на примере $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$;
- свойства привитых сополимеров на основе ТК/ТЖ и гидрогелей на их основе: состав, морфология поверхности, молекулярно-массовые характеристики, устойчивость, влагопоглощение, отношение к грибам,

биосовместимость гидрогелей на основе ТК как модели скаффолда и раневого покрытия;

- ферментативный гидролиз ТК/ТЖ и сополимеров на их основе;
- идентификация побочных реакций при синтезе гидрогелей в условиях фотокатализа в водной дисперсии в присутствии сложных оксидов;

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных результатов исследований и выводов подтверждается воспроизводимостью характеристик новых полимеров, использованием комплекса современных физико-химических методов анализа и испытаний, соотносением полученных экспериментальных результатов с данными, опубликованными в открытой печати, разносторонностью и обширностью экспериментального исследования.

Апробация работы и публикации. Основное содержание диссертации изложено в 12 научных статьях, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 7 статей в журналах, рецензируемых WoS и Scopus, 1 монографии, 2 патентах РФ и 10 тезисах докладов на конференциях различного уровня. Международные: International conference «Chemistry of Organoelement Compounds and Polymers» (Moscow, 2019), Международная научная конференция «Современная химическая физика на стыке физики, химии и биологии» (Черноголовка, 2021), XVII Международная научно-практическая конференция «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения» (Нальчик, 2021), XX Международная конференция по химии и физикохимии олигомеров (Суздаль, 2022, Самара, 2024), International conference “Materials science of the future: research, development, scientific training (MSF’2022, Nizhny Novgorod), Международная научно-практическая конференция «Приоритетные направления научных исследований. анализ, управление, перспективы» (Уфа, 2025). Всероссийские: XXII и XXIII Всероссийская конференция молодых ученых-химиков (Нижний Новгород, 2019, 2020), XXX Российская молодежная научная конференция с международным участием «Проблемы теоретической

и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2020), Девятая Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры – 2024» (Москва, 2024).

Соответствие диссертации паспорту специальности. Выполненная диссертационная работа по цели и задачам, научной новизне, актуальности исследований, содержанию и методам исследования соответствует пунктам 2, 5, 9 паспорта специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения.

Личный вклад автора являлся основополагающим на всех этапах выполнения работы и состоял в проведении синтеза полимерных материалов, подготовке образцов для исследований их свойств, проведении исследований, обобщении и систематизации полученных результатов, подготовке публикаций и докладов к научным конференциям.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 192 страницах, состоит из введения, 3 глав, заключения, списка используемой литературы (356 наименований), 3 приложений, благодарностей, включает 14 таблиц и 47 рисунков.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания (базовая часть 0729–2020-0053, FSWR-2023-0024, FSWR-2026-0006) и программы «Приоритет-2030».

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Получение новых материалов на основе природных полимеров приемами радикального инициирования

Радикальная активация полимеризационных процессов по-прежнему является распространенным способом получения полимерных материалов. Детальное и глубокое исследование особенностей элементарных стадий этого процесса, низкая селективность по отношению к мономерам разной природы, удобные условия проведения стали основой для развития разработок новых направлений получения полимерных материалов с использованием приемов радикальной химии. Основным недостатком традиционной радикальной полимеризации является гель-эффект, благодаря которому сложно контролировать свойства полимеров, прежде всего молекулярную массу, распределение молекулярной массы и архитектуру макромолекул, что затрудняет регулирование целого ряда его свойств [1]. Активно развиваются направления радикальной полимеризации, позволяющие исключить недостатки процесса, иными словами, современная полимерная наука нацелена на получение с использованием радикального инициирования материалов с макромолекулярным дизайном, свойства которых можно контролировать для применения их в различных сферах человеческой деятельности [2-5].

1.1.1. Радикальная привитая сополимеризация как способ получения современных материалов для медицины

Сополимеризация является хорошо известным и эффективным методом влияния на параметры процесса полимеризации и изменения свойств полимеров и приводит к образованию материалов с новыми свойствами [5, 6].

«Прививка» — это метод, при котором мономеры ковалентно связываются (модифицируются) с полимерной цепью. Привитые сополимеры можно получить тремя основными способами:

Grafting-to: в качестве прекурсора используется готовый полимер с реакционноспособной концевой группой, который затем присоединяется к основной цепи. Этот метод предполагает реакцию функциональных групп, расположенных на концах цепей одного вида полимера, с другими функциональными группами, которые случайным образом распределены по основной цепи другого полимера (основной цепи).

Grafting-from: мономер прививается к основной цепи. «Grafting-from» значительно более универсальна, чем «Grafting-to».

Grafting-through, другими словами, прививка с помощью прикрепленных к поверхности мономеров (макромономеров): при таком подходе полимеризация проводится в присутствии полимеров (основной цепи), к которым присоединены функционализированные мономеры. Присоединённые к поверхности мономеры встраиваются в растущие полимерные цепи так же, как и мономеры в растворе (мономеры в растворе обычно отличаются от мономеров, присоединённых к поверхности) [7].

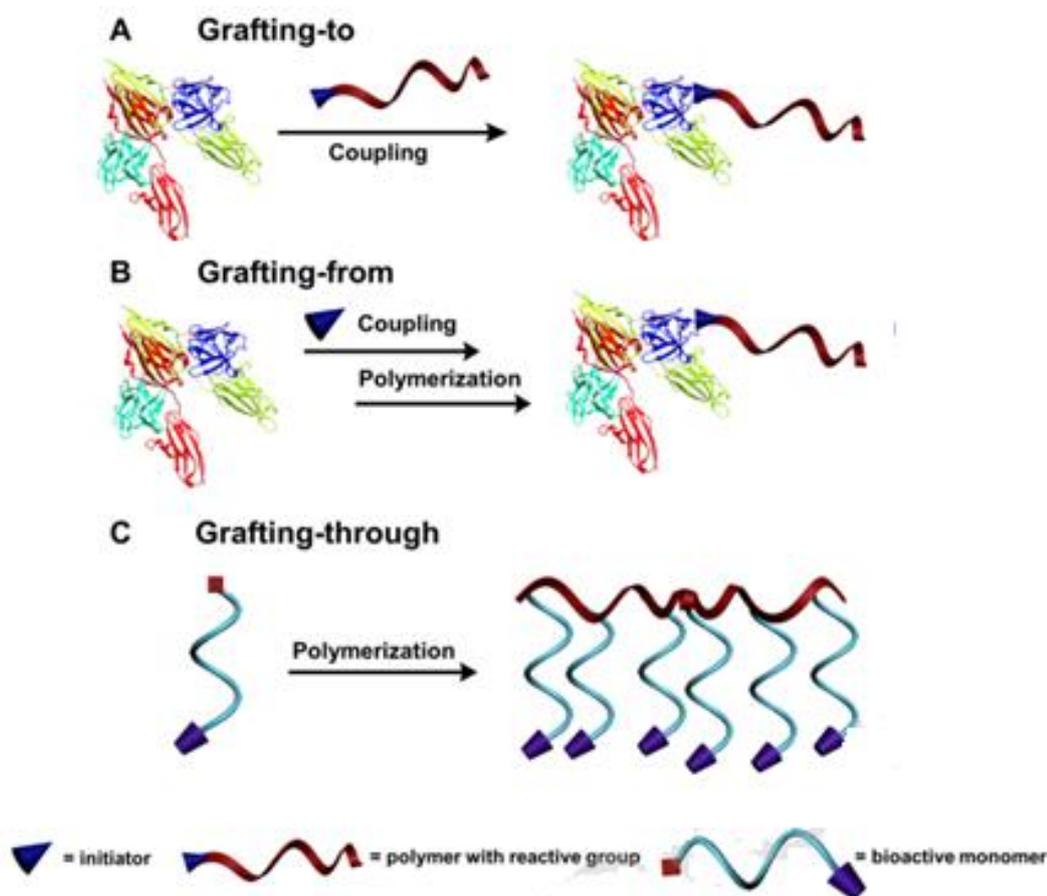


Рис. 1. Схема образования привитых сополимеров [6]

Привитая сополимеризация стала важнейшим подходом в разработке современных материалов для медицины, позволяющим регулировать характеристики материалов. Прививку новых фрагментов материала проводят, как правило, к цепи природного полимера, при этом изменяются физико-химические свойства и биологические характеристики базовых полимеров. Этот метод позволяет создавать специализированные полимеры для решения конкретных задач, в том числе для изменения механических свойств, водоудерживающей способности и морфологии [8].

Для реакций прививки используются коммерческие инициаторы, такие как бензоилпероксид, динитрил азобисизомасляной кислоты (ДАК), трет-бутилпероксид, персульфаты, т.е. инициаторы, расщепляющиеся при определённых температурах с образованием высокореактивных свободных радикалов. Ключевыми факторами для этих процессов являются контролируемые температур и концентрации инициаторов [9]. Наряду с этим используют окислительно-восстановительные инициаторы (реактив Фентона, нитрат аммония-церия и т.п.), которые создают окислительно-восстановительную систему, генерирующую свободные радикалы. Кроме того, известны окислительно-восстановительные системы с переносом электронов, такие как реакции клик-химии, используемые для полимеризации и модификации, в частности, азид-алкиновое циклоприсоединение, реакции Дильса-Альдера, реакции с участием тиолов и карбониллов и т.п. [10-12].

Более всего исследований связано с прививкой на полисахариды (целлюлоза, хитозан и др.) [8]. В контексте данной работы представляют интерес работы, связанные с радикальной прививкой на коллаген или его денатурированный аналог – желатин.

Привитые сополимеры на коллаген и желатин описаны для мономеров акрилового ряда: акриловая кислота (АК) [13, 14], акриламида [14-16], метакриламида и его производных [17], пропилена [18], винилпирролидона [19]. Чаще всего в качестве инициатора использовали персульфаты. В работе

[20], например, сополимер коллагена из сухожилий крысиных хвостов с полиметилметакрилатом в составе нанокompозита с PdO–TiO₂-g-ПММА-коллаген исследовали для замещения костной ткани. Схема образования композита, предложенная авторами, представлена на рис. 2. Следует отметить также, что перечисленные исследования, связанные с получением привитых сополимеров, выполнены с использованием коллагена животного происхождения.

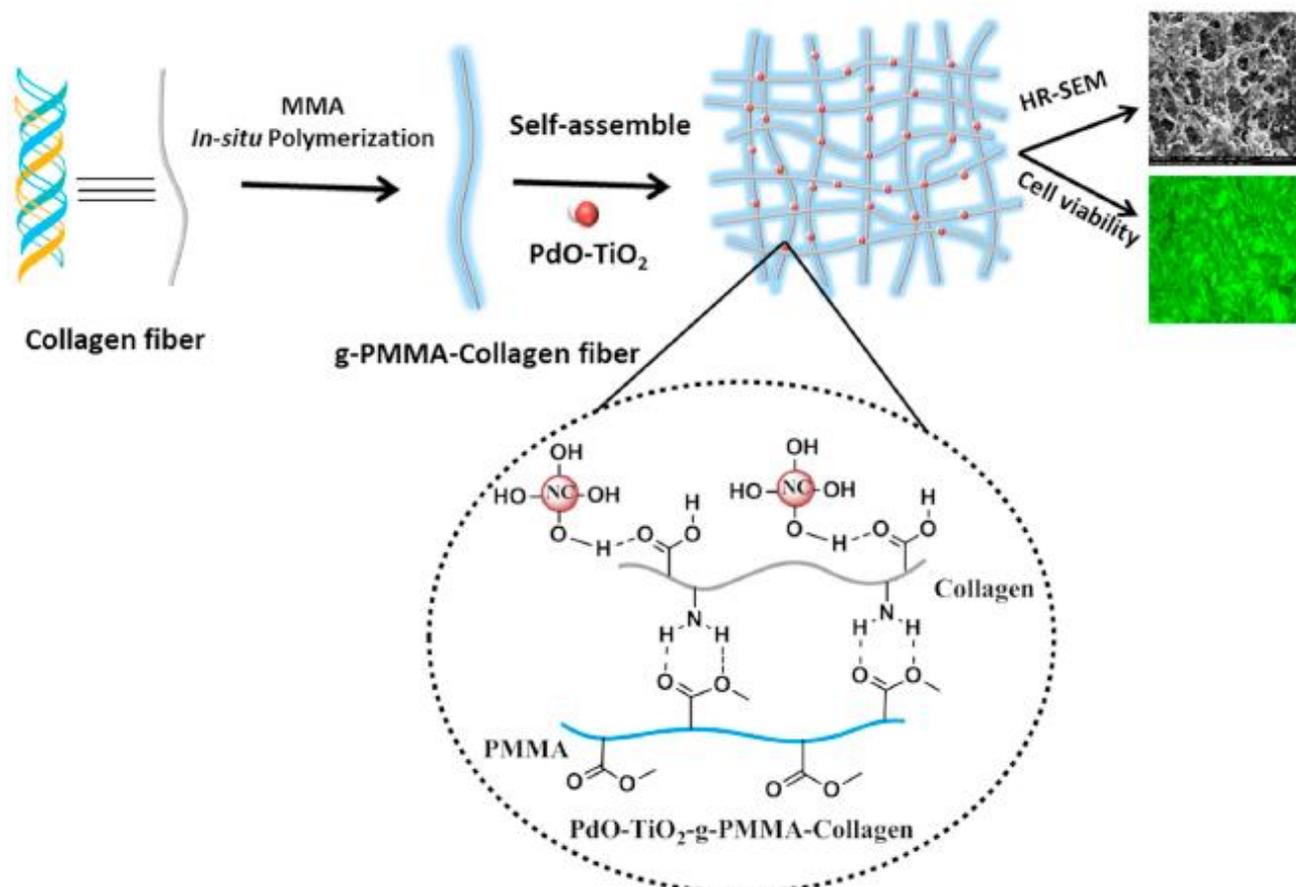
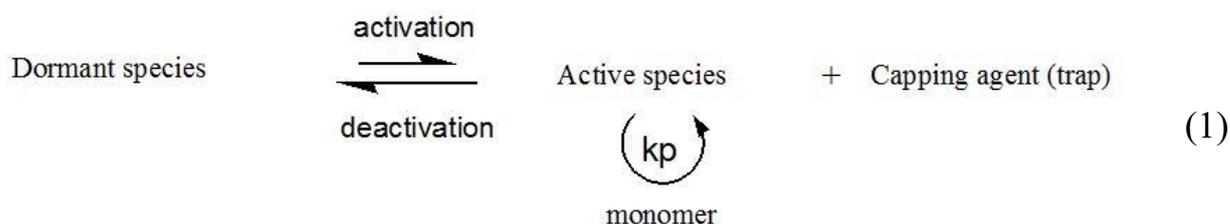


Рис. 2. Схема образования композита PdO–TiO₂-g-ПММА-коллаген [20]

Привитые сополимеры обладают большим потенциалом для получения новых свойств, благодаря своим структурным характеристикам (составу, длине основной цепи, длине ответвлений, расстоянию между ответвлениями и т.д.) [21, 22]. Тем не менее, для получения материалов медицинского назначения в последнее время широко используют еще и приемы контролируемой радикальной полимеризации.

1.1.2. Контролируемая радикальная полимеризация и ее возможности в получении новых материалов для медицины на основе природных полимеров

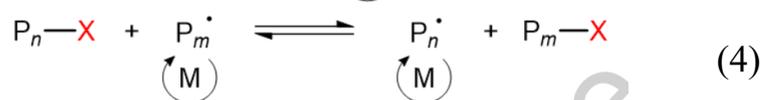
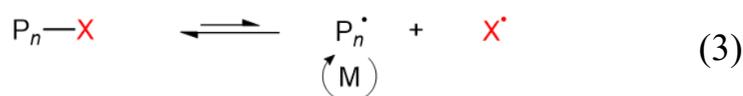
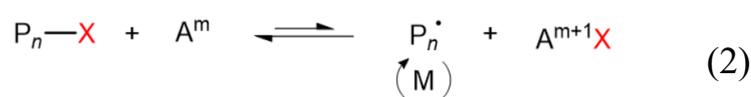
Контролируемая/живая радикальная полимеризация (в литературе иногда используют термины «псевдоживая», «квазиживая», «живая») представляет большой интерес как простой и надежный способ получения (со)полимеров с определенной структурой и заданным комплексом свойств. Свое название она получила вследствие того, что ей присущи некоторые закономерности, характерные для ионной «живой» полимеризации, когда отсутствуют реакции обрыва, и рост цепи проходит до полного исчерпания мономера [23, 24]. В 2010 году ИЮПАК рекомендовал использовать термин радикальная полимеризация с обратимой дезактивацией (Reversible-Deactivation Radical Polymerization - RDRP) в качестве охватывающей терминологии [25]. RDRP проходит по схеме обратимого ингибирования реакции роста цепи, как показано на схеме 1:



Был разработан ряд эффективных стратегий для RDRP, которые различаются по механизмам реакции, используемым реагентам и условиям. Однако их объединяет способность эффективно обеспечивать одновременный рост всех полимерных цепей. Этот равномерный рост цепей может быть достигнут, когда все цепи начинают расти в начале полимеризации, доля цепей, которые подвергаются обрыву, невелика по отношению к общему числу живых (бездействующих + активных) цепей, а динамика равновесия между бездействующими и активными цепями является быстрой по отношению к росту цепи и достигается с помощью средств контроля (X). При тщательном выборе условий полимеризации, а также инициатора (P₁-X) и регулирующего агента (X), концентрация

бездействующих полимерных цепей (P_n-X) значительно превышает концентрацию активных форм, размножающихся во время полимеризации (обычно $[P_n-X]/[P_n\cdot] > 100000$) [26], и необратимое прекращение взаимодействия активных распространяющихся радикалов может быть уменьшено таким образом, что полимеризация проявляет многие характеристики, обычно ассоциируемые с полимеризацией в реальном времени.

RDRP включает радикальную полимеризацию с переносом атомов – ATRP (схема 2) [27-33], полимеризацию, основанную на реакциях обратимой диссоциации-рекомбинации, протекающих с участием стабильных радикалов (Stable Free Radical Polymerization – SFRP, схема 3) [27, 28, 34], и обратимую полимеризацию с переносом цепи по механизму присоединения-фрагментации – RAFT (схема 4) [27, 28, 35-41].



Наиболее применяемыми в синтезе материалов для медицины являются разновидности RDRP – ATRP и RAFT. Эта стратегия позволяет создавать биоразлагаемые полимеры для применения *in vivo*. В обзоре [6] обобщены последние достижения в области ATRP для создания функциональных материалов и методов, применяемых для развития биомедицинской области, таких как модификация и функционализация поверхностей. Кроме того, сообщается о последних применениях и прогрессе материалов, полученных методом ATRP, в различных биомедицинских областях. Приводятся оригинальные примеры получения биомолекулярно-полимерных конъюгатов, конструкции, в которых используются функциональные или иные полезные свойства биомолекул в сочетании с синтетическими полимерами, обладающими специально подобранными свойствами. В целом

можно отметить, что ключевым моментом в синтезе новых гибридов биомолекул и полимеров является использование методов контролируемой полимеризации в сочетании с методами присоединения к субстрату, присоединения к носителю или присоединения через носитель, каждый из которых имеет свои преимущества и/или недостатки.

В работе [42] поверхность каркаса из поликарбоната и уретана модифицировали путем иммобилизации желатина. Наряду с этим, для увеличения количества иммобилизованного желатина, на эти каркасы PCU был привит поли(этиленгликоль)метакрилат (PEGMA) методом поверхностно-иницированной радикальной полимеризации с переносом атомов (SI-ATRP). Затем после аминирования и иммобилизации были получены каркасы PCU-g-PEGMA-g-желатин (рис. 3). Оба модифицированных каркаса были охарактеризованы химическими и биологическими методами и показали отличную антигемолитическую активность и превосходную способность к росту и пролиферации клеток.

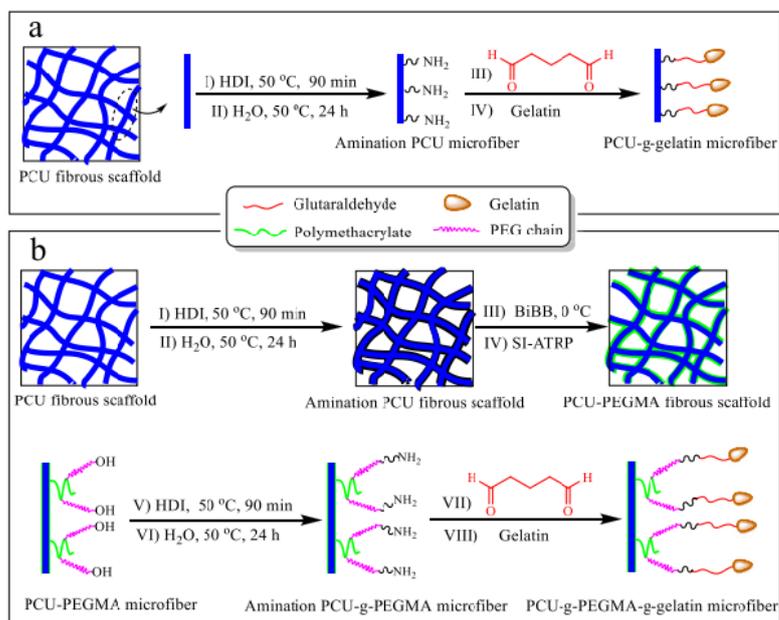


Рис. 3. Два способа модификации для иммобилизации желатина на поверхности каркаса PCU с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента: прямая иммобилизация желатина на поверхности каркаса PCU с аминогруппой (a), PEGMA был привит на поверхность каркаса с помощью SI-ATRP (b) [42]

В работе [43] для создания антибактериальной перевязочной ткани на бактериальную целлюлозу (BC) был привит поликатионный гель с использованием поверхностно-иницированного активатора, регенерированного путем переноса электронов и атомов в радикальной полимеризации (SI-ARGET ATRP), с последующей кватернизацией. Диметилэтилметакрилат (DMAEMA) был успешно полимеризован на поверхности BC (рис. 4), что было подтверждено методом ИК-спектроскопии и элементным анализом. Наряду с этим, были охарактеризованы морфологическая структура, удельная площадь поверхности, размер пор и механические свойства.

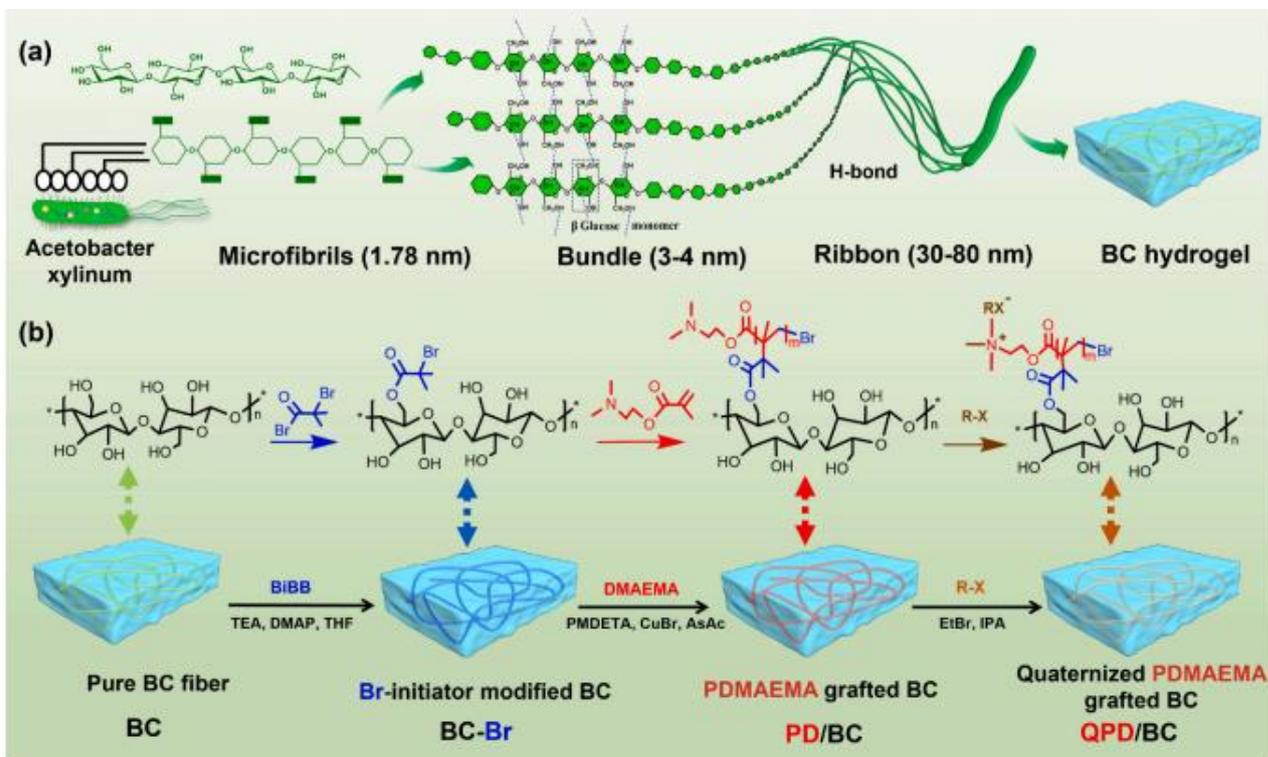


Рис. 4. Схематическое изображение получения BC (a) и антибактериальных гидрогелей QPD/BC (b) [43]

Таким образом, новые направления радикальной полимеризации, в первую очередь, приемы привитой сополимеризации, используемые в данной работе, позволяют изменять свойства исходных компонентов с целью получения материалов со свойствами, пригодными для медицинских целей. Основой для получения новых гидрогелевых структур для медицины в

данной работе является белок – тресковый коллаген. В связи с этим в следующей главе рассмотрены особенности природы белковых природных соединений.

1.2. Особенности природы белковых природных соединений

Природные полимеры – это высокомолекулярные соединения, характеризующиеся линейными длинноцепочечными структурами и повторяющимися соединениями звеньев. Они абсолютно нетоксичны и могут быть классифицированы как пептиды, белки, полисахариды, каучук и смолы [44]. В разработке новых материалов для медицины значительное внимание уделяется белкам благодаря их разнообразию и продуктивному применению. Белки, являющиеся основными строительными блоками жизни, представляют собой органические макромолекулы, состоящие из аминокислот в различных соотношениях и последовательностях. Конкретный аминокислотный состав и последовательность звеньев определяют свойства и функциональные типы белков, тесно связывая их с жизненными процессами и деятельностью различных организмов. Белки из сходных источников часто имеют аналогичный аминокислотный состав, что указывает на сходные функциональные свойства. Белки могут быть классифицированы на основе их исходного происхождения — растительные белки (например, белки зерна, зеленых листьев, бобовых) [45] и животные белки; или их молекулярной формы — сферические белки (водорастворимые, шарообразные), волокнистые белки (нерастворимые, стержневидные или волокнистые) и мембранные белки (почти сферические, интегрированные в биопленки или связанные с ними).

Исследования показали, что белки и пептиды проявляют потенциальную терапевтическую активность, включая противодиабетические, противоопухолевые и противовоспалительные свойства [46]. Помимо применения в медицине, белки широко используются в хлебопекарной, молочной промышленности и производстве напитков

благодаря своим функциональным свойствам, которые не только улучшают вкусовые качества продуктов, но и обеспечивают их питательную ценность. Ключевые функциональные свойства включают растворимость белка или азота, способность поглощать воду, способность удерживать воду, способность к пенообразованию, стабильность пены и способность к эмульгированию [47].

Белки наряду с этим обладают большим потенциалом для упаковочных материалов пищевых продуктов. Полимеры на основе белков обладают высокой пленкообразующей способностью, что позволяет создавать пленки с высокой питательной ценностью и способностью к биологическому разложению. Эти пленки/покрытия обладают превосходными газобарьерными свойствами и механическими свойствами по сравнению с пленками, изготовленными из полисахаридов и липидов. Например, пленки из сывороточного протеина имеют повышенную проницаемость для кислорода и углекислого газа. Исследования показали, что покрытия из сывороточного протеина могут улучшать кислородозащитные свойства пленок из чистой полимолочной кислоты примерно на 90%, а свойства, препятствующие проникновению водяного пара, примерно на 27% [48], тем самым продлевая срок хранения продуктов.

1.2.1. Методы модификации природных белков

Возможность модифицировать белки значительно расширяет область их применения. Модификация на молекулярном уровне включает изменение основной цепи или групп боковых цепей белковых молекул, что приводит к изменениям в их пространственной структуре и физико-химических свойствах. Методы модификации можно разделить на физические, химические и ферментативные [49]. Физические модификации, как правило, не изменяют первичную структуру белков и обладают такими преимуществами, как низкая стоимость, нетоксичность, короткое время действия и минимальное влияние на питательные свойства. Такие методы,

как обработка под высоким давлением, гомогенизация под высоким давлением, экструзионная обработка, ультразвук, холодная плазма, озон и облучение электронным пучком, являются хорошо известными “зелеными” технологиями, которые улучшают свойства белка [50]. Эти методы часто используются для регулирования денатурации белка, способствуя превращению исходных белковых агрегатов в более мелкие молекулярные образования, активируя функциональные группы и уменьшая чрезмерную денатурацию, вызванную термическим воздействием. Такие поля, как импульсное электрическое, микроволновое, радиочастотное и гамма-излучение, также используются для настройки структуры и функций белка [51, 52].

Химическая модификация, как стратегия, включает в себя введение различных функциональных групп или макромолекул в структуру исходного белка с образованием новых связей, путем добавления химических реагентов к белку или разрыв части пептидной цепи. Химические модификации обычно связаны с реакционной способностью amino-, гидроксильной, сульфгидрильной и карбоксильной группами белков для изменения характеристик конечного материала, суммарного заряда, гидрофобных и функциональных свойств. Еще одним эффективным методом является ферментативный гидролиз, при котором белки расщепляются на свободные аминокислоты и пептиды для улучшения растворимости, эмульгирующих свойств, пенообразующих свойств и других функциональных характеристик [53].

Среди всех методов химической модификации привитая сополимеризация, известные данные о которой приведены в разделе 1.1.1, выделяется тем, что благодаря ей происходит образование стабильных ковалентных связей между природными полимерами и функциональными материалами. В отличие от чисто физического смешивания, привитая сополимеризация обеспечивает долговременную химическую стабильность и позволяет легко контролировать плотность привитых цепей. Этот метод не

только обеспечивает стабильность, но и придает полимеру уникальные свойства [54]. Достижение высокой эффективности прививки при модификации белковых привитых сополимеров в значительной степени зависит от реакции, на которую влияет множество факторов. Выбор подходящей системы инициирования может значительно повысить эффективность прививки. Важно, чтобы активные участки были стратегически расположены в полимерной цепи, что способствует образованию привитых сополимеров после полимеризации. Общие эксплуатационные характеристики привитых материалов в первую очередь определяются типами, составом и общим количеством используемых мономеров. Кроме того, точный контроль молекулярной массы и полидисперсности играет решающую роль в моделировании как структурных свойств, так и биологической активности получаемых белково-полимерных конъюгатов. Поскольку белково-полимерная химия находится в стадии становления, присущие ей сложность и разнообразие создают уникальные проблемы, в частности, различные варианты введения мономеров в белки позволяют получать продукты с различными функциональными возможностями.

В случае коллагена, в том числе и рыбного, наиболее изученными методами химической модификации является смешивание с другими полимерами с образованием ионных и межмолекулярных взаимодействий, чаще всего, биополимерами, или сшивка макромолекулярных цепей специальными сшивающими агентами: генипином, ГА и т.п. Для получения нужных характеристик в состав таких смесевых составов с коллагеном вводят полисахариды, синтетические полимеры, модификаторы разной природы, проводят ультразвуковое, радиационное облучение и другие способы для повышения прочности материала [55]. В результате улучшаются физико-химические свойства материалов на основе модифицированного коллагена, такие как механические свойства, стабильность и температура денатурации.

Как уже отмечалось ранее в разделе 1.1.1, для получения материалов медицинского назначения на основе коллагена, таких, как гидрогели для раневых покрытий и скаффолдов, метод привитой радикальной сополимеризации встречается редко. Чаще всего, такие синтезы многостадийны, как это описано в работе [19] для получения сополимера коллагена и гидрофильных синтетических полимеров ПЭГ и поливинилпирролидона в присутствии ДАК. В приведенных примерах основой материалов для медицины является коллаген животного происхождения, однако рыбный коллаген имеет целый ряд преимуществ перед животным коллагеном в плане использования в медицинских целях. Сравнительные данные таких исследований приведены в следующем разделе.

1.2.2. Особенности рыбного и животного коллагена/желатина

В настоящее время предпочтение имеют разработки биodeградируемых и биосовместимых композитных структурированных материалов на основе природных полимеров, среди которых лидирующие позиции занимает коллаген, или его денатурированный аналог – желатин [56-63]. Это связано, в первую очередь, с их биосовместимостью, биоразлагаемостью и слабой антигенностью. Следует обратить внимание на то, что коллаген является термически нестабильным полимером: его денатурация с образованием желатина начинается при температурах выше 30-40 °С.

Молекула коллагена представляет собой левостороннюю спираль из трех α -цепей, состоящих из известных аминокислотных остатков вокруг общей оси. В водных растворах такая макромолекула дополнительно стабилизируется за счет водородных связей с водой. Молекула желатина представляет собой денатурированную спираль с разорванными связями отдельных α -цепей и в водных растворах образует агрегаты между межмолекулярными свободными частями α -цепей в растворе. Вследствие этого полипептидные цепи желатина в разбавленных водных растворах

образуют компактные клубки, частично проницаемые для растворителя. Сравнительные данные о свойствах гибридных материалов на основе коллагена и желатина чаще всего получены с использованием белков животного происхождения [64-70]. Как правило, в медицинских изделиях, свойства материалов на основе коллагена и желатина заметно не отличаются. Так, например, в работе [71] на доклинической модели животного (овцы) коллагеновый пластырь показал безопасность и эффективность, сравнимые с желатиновым матриксом и превосходящие заживление без покрытия. В работе сравнивались гистологические показатели внутри групп и между ними с течением времени. Существенных различий в среднем показателе воспаления между группами в начале испытаний обнаружено не было. На 7-й день в группе без покрытия наблюдался самый высокий уровень воспаления (от слабого до умеренного), за которым следовали коллагеновые покрытия (от слабого до умеренного) и желатиновые покрытия (от минимального до умеренного). На 120-й день воспаление было самым высоким в группе без покрытия (от минимального до умеренного), при этом и коллагеновой и желатиновое покрытия показали минимальное воспаление.

Среди 28 известных видов коллагена коллаген первого типа самый архетипичный тип [72]. Важнейшие типы для человека представлены в таблице 1 [73, 74].

Таблица 1. Типы коллагена и их роль в организме

Тип коллагена	Роль в организме человека
I	около 90 % всего коллагена в организме; обеспечивает прочность костей, сухожилий, связок и кожи; поддерживает упругость и гладкость кожи; составляет 80 % коллагена в коже
II	структурный белок хрящевой ткани поддерживает амортизационные свойства суставов; предотвращает износ хрящей
III	присутствует в стенках кровеносных сосудов и внутренних органах; участвует в заживлении тканей; влияет на поведение клеток (прикрепление, миграцию, деление, дифференцировку); играет роль в свёртывании крови (взаимодействует с тромбоцитами)
IV	сетчатый, входит в состав базальных мембран
VI	присутствует в хрящах
VII	содержится в коже и мягких тканях
IX	входит в состав хрящей
XI	присутствует в хрящах
XIX	распределён по всему организму
XXII	встречается в местах соединения мышц и сухожилий, обеспечивает нормальную работу сухожилий, присутствует практически во всех тканях животных (в коже, костях, роговице глаза, в склере, в стенке артерий и т.д.)

В материалах для медицины более всего известны бычий и рыбный коллаген [75-80]. У каждого из них есть свои преимущества с точки зрения регенеративной медицины. Результаты сравнительного анализа способности к заживлению материалов на основе этих двух разновидностей противоречивы. Тем не менее, результаты о преимуществе рыбного коллагена обнаружены. Так, в работе [81] исследовали бесклеточный трансплантат из кожи рыбы (Keracis®) и широко используемый трансплантат из бычьего коллагена (ProHeal®). Трансплантаты оценивались не только с

точки зрения их биофизических свойств, но и с точки зрения их *in vitro* клеточной активности при использовании фибробластов, кератиноцитов и эндотелиальных клеток человека. В ходе клинического исследования оценивалось заживление ран у 52 пациентов с обширными ожогами, которым с января 2019 года по декабрь 2020 года была проведена пересадка кожи с донорских участков. Исследование проводилось в двух группах: в одной группе тестировался только Kerecis®, а в другой сравнивались Kerecis® и ProHeal®. В обеих группах перевязочный материал накладывался на один-два дня после пересадки расщепленной кожи на донорские участки. В группе, получавшей лечение препаратом Kerecis®, заживление происходило быстрее, чем в другой группе. В частности, среднее время заживления ран при использовании препарата Kerecis® и ProHeal® составило $10,7 \pm 1,5$ дня и $13,1 \pm 1,4$ дня соответственно. Авторы связывают более быстрое заживление при использовании препарата Kerecis® по сравнению с ProHeal® с синергетическим эффектом уникальной биофизической структуры и биоактивных компонентов бесклеточной кожи рыб.

В последнее время рыбный коллаген все увереннее вытесняет в исследованиях для медицины коллаген наземных животных, в связи с тем, что он является гипоаллергенным, так как на 96% идентичен человеческому белку, не является переносчиком инфекционных заболеваний животных, передающихся человеку, его использование не противоречит религиозным представлениям [68, 82, 83]. Кроме того, к достоинствам новых материалов на основе рыбного коллагена добавляется и экологическое преимущество исходного материала – природное возобновляемое сырье, чаще всего отходы производств, и перспективность широкого использования в самых различных областях. Различные исследования показали, что морской коллаген обладает отличными свойствами клеточной адгезии, способствует реэпителизации и восстановлению кожи, а также стимулирует синтез различных факторов для ускорения заживления ран. Таким образом, морской коллаген можно

использовать для изготовления биоматериалов, предназначенных для заживления ран [84].

Следует обратить внимание на то, что раневые покрытия на основе белков способны к биодеградации (биорезорбции) в период их использования и замещаются живой тканью. Биорезорбция проходит как ферментативное разрушение под действием протеолитических ферментов организма. Благодаря этому свойству раневые покрытия на основе природных полимеров могут проявлять биологическую активность [85]. Некоторые аспекты биоразрушения коллагена и материалов на его основе представлены в следующем разделе.

1.3. Гидрогелевые материалы на основе белков: особенности, получение и применение

Гибридные полимерные материалы на основе природных полимеров находят применение в различных составах для заживления раневых дефектов, скаффолд-технологиях, тканевой инженерии, а новые подходы к получению таких продуктов делают разработки важным инструментом в выборе нужных направлений управления процессом выздоровления человека. В настоящее время востребованность материалов, имеющих в первую очередь высокий регенеративный потенциал, крайне высокая в силу недостатка таких материалов, активно проходит замена ассортимента традиционных перевязочных материалов (бинты, марлевые повязки и т.п.) на гидрогелевые с широкой областью действия. Раневые покрытия для заживления ран любой этиологии (гидрогели на основе натуральных полимеров), как уже отмечалось ранее, имеют ряд неоспоримых достоинств: биосовместимость, биоразлагаемость, регенерирующие и противовоспалительные свойства и т.д.

Тканевая инженерия определяется как сочетание материалов, технологий и клеток для улучшения или замены биологических органов. Для этого необходимо найти подходящие типы клеток и культивировать их в

подходящем каркасе в соответствующих условиях. Гидрогели являются привлекательным материалом для каркасов, поскольку их структура похожа на внеклеточный матрикс (ВКМ) многих тканей, их часто можно обрабатывать в относительно мягких условиях, и их можно вводить минимально инвазивным способом [86]. ВКМ в живых организмах играет ключевую роль в управлении многочисленными клеточными судьбами и в значительной степени влияет на восстановление поврежденных органов и тканей [87, 88]. До настоящего времени структуры, компоненты и свойства природных ВКМ были четко проиллюстрированы, и большинство природных ВКМ имеют пористые сетчатые матрицы, которые обычно состоят из некоторых нановолоконных материалов, таких как коллаген, фибронектин и ламинин [89]. Подобно природным ВКМ, гидрогели в виде искусственных ВКМ с трехмерными сетчатыми структурами изготавливаются для обеспечения микросреды [90] для адгезии, пролиферации и миграции клеток, и способствуют обмену питательными веществами и сигнальными молекулами [86].

Гидрогели представляют собой гидрофильные, нерастворимые в воде полимерные макромолекулы, представленные в виде полуоткрытых сетчатых систем, состоящих из запутанных цепочек или коротких нитей различной длины, соединенных между собой поперечными связями. Жесткость и влагопоглощающая способность гидрогелей обусловлены наличием гидрофильных компонентов, прикрепленных к основной структуре, таких как спирты, карбоновые кислоты и амиды, в то время как наличие поперечных связей делает их устойчивыми к растворению в водной среде [91]. При воздействии термодинамически совместимого растворителя (воды или любой биологической жидкости) они могут задерживать большую часть растворителя в порах или промежуточных пространствах и достигать полностью набухшего состояния [92]. Набухание включает в себя сорбцию молекул растворителя в порах или пустотах в макромолекулярной структуре гидрогеля. Следовательно, пористость представляет собой важный физико-

химический параметр, на основании которого гидрогели могут быть классифицированы как непористые, микропористые, макропористые и сверхпористые [93, 94]. Набухание сопровождается изменением размеров, что приводит к резкому изменению реологических характеристик и, в конечном счете, к фазовому переходу [91]. Эти молекулы природного или синтетического происхождения обладают присущими им физико-химическими характеристиками, такими как гидрофильность, способность к набуханию, гелеобразованию, механическая прочность, пористость, биосовместимость и биоразлагаемость, что позволяет использовать их в различных отраслях промышленности в области очистки воды, ионообменной хроматографии, повышения нефтеотдачи пластов, разработки сенсоров, удаления загрязнений, токсичных материалов, разработка иммобилизованных ферментных систем, в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, фармацевтики, медицине и биомедицине [93, 95]. Поскольку гидрогели представляют собой гидрофильные полимерные сети, сшитые тем или иным способом для создания эластичной структуры, для их получения можно использовать любую стратегию, позволяющую создать сшитую сеть [93].

Существуют различные критерии классификации гидрогелей, такие как: источник (включая природные, синтетические и гибридные гидрогели), ионный состав (включая катионные, анионные и неионные гидрогели), способ сшивания (включая физические и химические гидрогели с поперечными связями), физические свойства (включая интеллектуальные и обычные гидрогели), чувствительность (включая химически, биохимически и физически чувствительные гидрогели) и способы получения (включая сополимерные, гомополимерные и взаимопроникающие гидрогели). Характер набухания, способность к разложению и кристаллическая структура являются другими критериями для классификации гидрогелей [96-99].

Для улучшения механических характеристик природного гидрогеля используются различные методы, такие как химическое и физическое сшивание [100]. Физически сшитые сети часто называют «обратимыми» или «физическими» гелями, поскольку их можно растворить, изменив условия окружающей среды, такие как pH, ионная сила или температура [95]. Они обладают временными связями, возникающими либо в результате переплетения полимерных цепей, либо в результате физической гелеобразования под воздействием таких стимулов, как ион-ионное взаимодействие, водородные связи, термоиндуцированное гелеобразование, комплементарное связывание, образование комплексов включения и гидрофобные взаимодействия [93]. Физически сшитые гидрогели представляют большой интерес для инкапсуляции биоактивных веществ и клеток [101]. Химически сшитые гидрогели также называют «постоянными» или «химическими» гелями, которые представляют собой сети, сшитые ковалентными связями посредством химических реакций для достижения сшивки макромолекулярных цепей в растворе. Для применения в биомедицине предпочтительно, чтобы сшивание происходило в водной среде и в мягких условиях. Реакции не должны повреждать клетки или биофункциональные молекулы в матрице гидрогеля. Используемые реакции не должны приводить к образованию токсичных побочных продуктов и не должны требовать высоких температур или катализаторов, токсичных для клеток [102].

Химическое сшивание является наиболее распространённым и высокоэффективным методом образования гидрогелей *in situ*, обладающие превосходной механической прочностью. Существует две широко используемые стратегии получения химически сшитых гидрогелей. Первая стратегия называется «3D-полимеризация» и заключается в полимеризации гидрофильных молекул, таких как акрилаты и виниловые мономеры, в присутствии многофункциональных сшивающих агентов. Недостатком 3D-полимеризации является значительное количество непрореагировавших

мономеров и других малых молекул, которые могут быть токсичными и требуют тщательной очистки. Вторая стратегия заключается в непосредственном сшивании гидрофильных полимеров, что позволяет избежать тщательной очистки, поскольку в системе остаётся не так много токсичных малых молекул. Водорастворимые полимеры, такие как полиакриловая кислота, поливинилацетат, ПЭГ, полиакриламид и полисахариды, широко используются в биомедицинских и фармацевтических целях благодаря своей нетоксичности и биосовместимости [95].

Свободно-радикальная полимеризация является привлекательной стратегией сшивания при синтезе гидрогелей благодаря своим преимуществам по сравнению с другими методами полимеризации. Во-первых, она характеризуется высокой реакционной способностью, что позволяет получать полимеры с высокой молекулярной массой (ММ) и плотностью сшивания. Во-вторых, свободнорадикальная полимеризация допускает использование различных функциональных групп и протекает в мягких условиях, даже в водной среде. Это делает её простым способом синтеза сшитых гидрогелей [2].

Сшивание методом ферментативного катализа. Ферменты можно использовать для расщепления или образования химической связи с большей эффективностью, чем другие методы. Благодаря короткому времени реакции и специфичности ферменты используются для каталитического сшивания для формирования гидрогелей без взаимодействия с другими химическими функциональными группами в макромолекулах. Ферментативное сшивание происходит в мягких условиях реакции, таких как водная среда, нейтральный рН или низкие температуры [103]. Наиболее изученными ферментами для приготовления гидрогелей являются пероксидаза хрена, трансклутаминаза, тирозиназа, фосфопантеин-трансфераза и лизил-оксидаза [104]. Эти реакции обеспечивают исключительный контроль над формированием гидрогелей, способствуя повышению их сложности, нетоксичности и неинвазивности. Несмотря на основные преимущества ферментативных реакций, к

недостаткам этого подхода можно отнести нестабильность некоторых ферментов и недостаточные механические свойства образующихся гелей [105, 106].

Сшивание гидрогеля с помощью «клик-химии». Клик-химия – это набор зачастую биосовместимых химических реакций, которые приводят к быстрому образованию ковалентных связей. Реакции клик-химии протекают в одностадийной системе, имеют высокую термодинамическую движущую силу (более 20 ккал/моль), не нарушаются под воздействием воды, обладают высокой специфичностью и образуют минимальное количество побочных продуктов [107]. Благодаря биосовместимости, надёжности и специфичности реакций клик-химии, они часто используются в биомедицинских приложениях, таких как разработка лекарств и создание биоматериалов [108]. Примеры нескольких классических методов сшивания: реакция Дильса-Альдера, реакция с основанием Шиффа, реакция с оксимом и реакция присоединения по Михаэлю.

В большинстве случаев для того, чтобы ковалентно связать белок с полимерной поверхностью, последняя должна быть функциональной (функциональные группы, поступающие из мономеров, используемых во время реакции полимеризации) или функционализированной (пост-модификация поверхностей). Природа функциональных групп довольно ограничена, и для выполнения таких реакций прививки используется лишь несколько различных функциональных групп. Одна из основных стратегий ковалентного связывания белков с полимерными поверхностями заключается в использовании аминогрупп, присутствующих на белках (что предотвращает сложную модификацию белков) и в их реакции с функциональными группами-антагонистами, такими как эпоксиды, альдегиды, карбоновые кислоты или даже гидроксильные группы через связующий агент. Целевая реагирующая группа зависит от химической природы поверхности [54].

Другая важная функциональная группа, которую ищут на поверхностях, это альдегид, поскольку он может легко реагировать с

аминогруппами белков, давая иминную функцию. Поскольку эта реакция может быть обратимой, для того чтобы со временем обрести стабильность, иногда необходимо уменьшить иминную функцию до очень стабильного вторичного амина. Поскольку альдегидные группы почти никогда не присутствуют «естественно» на полимерах, поверхности должны быть модифицированы/активированы различными способами в зависимости от химической природы полимера. Среди активации поверхностей альдегидом, использование ГА в качестве «наклейки» между белком и поверхностью, вероятно, является наиболее используемым способом иммобилизации белков на полимерных поверхностях. Химия ГА не полностью изучена, поскольку она может приводить к нескольким видам структур (линейные полимеры, 6-членные единицы и т. д.) [109]. Тем не менее, примеры из литературы предполагают, что одна часть ГА может реагировать либо с аминогруппами, присутствующими на поверхности, либо с 2 гидроксильными группами, также присутствующими на поверхности, а другая альдегидная функция может реагировать с аминогруппой белка. Эта техника применялась либо с синтетическими, либо с натуральными полимерами, либо со смесями двух типов полимеров. Среди используемых синтетических полимеров можно назвать полибутилакрилат, полиамиды или полиакриламид, из природных полимеров наиболее описан хитозан [54].

На сегодняшний день гидрогели применяются в широком спектре биомедицинских областей, включая тканевую инженерию, 3D-биопечать, доставку лекарств, доставку генов, заживление ран, исследования в области микробиологии и онкологии [95]. Гидрогели являются эффективными носителями для точной доставки факторов роста, белков и различных сигнальных молекул, необходимых для регенерации тканей. Регулируя кинетику высвобождения, гидрогели способствуют таким клеточным реакциям, как ангиогенез и дифференцировка, которые необходимы для эффективного заживления и восстановления тканей [96, 110]. Гидрогели играют ключевую роль в 3D-биопечати, выступая в качестве «биочернил»

для создания сложных тканевых структур [111]. Исследователи могут создавать индивидуальные тканевые копии, которые будут точно воспроизводить структуру и функции биологических тканей, путём добавления клеток и биоактивных соединений в чернила на основе гидрогеля. Биопечать с использованием гидрогелей открывает широкие возможности для создания искусственных органов и сложной регенерации тканей. Инъекционные гидрогели можно вводить малоинвазивно, они затвердевают *in situ*, обеспечивая структурную поддержку поврежденным тканям [112-114].

Гидрогели широко используются в тканевой инженерии, благодаря своей биосовместимости, способности имитировать свойства живой ткани и контролируемой диффузии питательных веществ и метаболитов [115]. Регенерация органов и тканей после повреждения или заболевания представляет собой серьезную клиническую проблему. Дефекты тканей и органов или частичная потеря функций не только влияют на качество жизни пациента, но и могут представлять угрозу для жизни [116-118]. Хотя ткани и органы человека обладают врожденной способностью к заживлению, они не могут справиться с серьезными повреждениями. Предпочтительным методом лечения традиционных повреждений тканей является трансплантация органов, которая в настоящее время затруднена из-за нехватки донорских органов, предрасположенности к отторжению и перекрестному инфицированию. В последние годы методы тканевой инженерии быстро развиваются в качестве альтернативных методов лечения дефектов органов и тканей. Тканевая инженерия объединяет знания о механических материалах с клеточно-молекулярной биологией для создания биологически активных тканей или заменителей органов для замены, восстановления или даже улучшения функций пораженных тканей и органов [119, 120]. Гидрогели можно функционализировать или изготовить в соответствии с уникальными потребностями или характеристиками различных тканей, регулируя их механические свойства, размеры пор и скорость разложения, тем самым

способствуя пролиферации различных типов клеток [121-123]. Благодаря достижениям в этой области, технологии тканевой инженерии в настоящее время применяются для устранения повреждений многих органов и тканей, таких как мышцы, кости, кожа и т.д., а также играют важную роль во многих областях, таких как системы транспортировки лекарств и разработка искусственных органов. Тканевая инженерия включает в себя три основных элемента для поддержки клеточной регенерации тканей: подходящие источники клеток, биоактивные компоненты и соответствующие строительные материалы [124-127]. Клетки в основном получают из организма конкретного пациента и культивируют *in vitro*, вводят в каркасный материал и имплантируют в организм [128]. Во время таких процессов факторы роста и другие активные ингредиенты используются в качестве вспомогательных материалов для стимулирования ангиогенеза и пролиферации клеток, а также для управления координацией клеточной активности в тканях [129]. Во многих стратегиях для создания тканей используются скаффолды – каркасы. Эти скаффолды служат синтетическим ВКМ, обеспечивающим трёхмерную архитектуру для клеток и направляющим рост и формирование желаемых тканей. Гидрогели являются универсальными каркасами, которые могут поддерживать имплантированные клетки. Эти каркасы можно использовать для заполнения пространства, доставки биоактивных молекул и клеток/тканей [130]. Несмотря на преимущества коллагеновых гидрогелей, быстрая деградация коллагена (следовательно, слабая механическая прочность), непрозрачность или высокая усадка ограничивают его широкое применение в тканевой инженерии [131, 132], что также влияет на клиническую пригодность в тканях, для которых может потребоваться более высокая жесткость, таких как кости или хрящи. При разработке материалов для скаффолдов на основе природных белков используют прием введения в их состав фрагментов синтетических полимеров, которые способствуют формированию необходимых пространственно-геометрических структур [133-138].

Известно, например, что скаффолды на основе коллагена и акрилатов обладают улучшенными механическими свойствами и цитосовместимостью [20, 139-141].

Заживление ран – сложный процесс, требующий баланса между воспалительной и сосудистой активностью в соединительной ткани и эпителиальных клетках. Для регенеративного процесса необходимы важные элементы, которые активируют естественные процессы ангиогенеза, активации факторов роста и регенерации в рамках хорошо структурированного и биомиметического последовательного процесса [142]. Гидрогелевые повязки для ран широко изучаются, поскольку гидрогели способствуют заживлению ран за счёт удержания влаги и поддержания гомеостатической среды [143-145].

Инфекционные заболевания, вызываемые патогенными микроорганизмами, такими как бактерии, вирусы и паразиты, по-прежнему представляют собой проблему для общественного здравоохранения, несмотря на значительный прогресс в области здравоохранения и медицинских технологий. Лечение инфекционных заболеваний традиционными антибиотиками часто приводит к развитию устойчивости к ним [146]. Была разработана стратегия лечения инфекционных заболеваний с использованием антимикробных гидрогелей. Гидрогели воздействуют на всю клеточную мембрану, что приводит к её разрыву, за которым следует утечка содержимого цитоплазмы и гибель клетки. В ходе недавних исследований были разработаны различные типы антимикробных гидрогелей [147-150].

1.4. Ферментативное разрушение и биodeградируемость белков и материалов на их основе

Важнейшим условием для того, чтобы материал можно было назвать биоматериалом, является биосовместимость, то есть способность материала вызывать соответствующую реакцию организма в конкретной области применения. Реакция тканей на имплантат зависит от множества факторов,

начиная от химических, физических и биологических свойств материалов и заканчивая формой и структурой имплантата. В случае с биоразлагаемыми биоматериалами их активная биосовместимость должна быть продемонстрирована в долгосрочной перспективе. Химические, физические, механические и биологические свойства биоразлагаемого материала со временем меняются, и в результате разложения могут образовываться продукты, которые имеют другой уровень совместимости с тканями по сравнению с исходным материалом [151]. Некоторые из присущих полимерным биоматериалам свойства, которые могут влиять на их биосовместимость, включают: химический состав материала, молекулярную массу (ММ), растворимость, форму и структуру имплантата, гидрофильность/гидрофобность, смазывающую способность, поверхностную энергию, влагопоглощение, механизм разрушения и эрозии.

Некоторые важные свойства биоразлагаемого биоматериала можно обобщить следующим образом [152]:

- Материал не должен вызывать устойчивую воспалительную или токсическую реакцию при имплантации в организм;
- Материал должен иметь приемлемый срок годности;
- Время разложения материала должно соответствовать процессу заживления или регенерации;
- Материал должен обладать соответствующими механическими свойствами для указанного применения, а изменение механических свойств в процессе разрушения должно быть совместимо с процессом заживления или регенерации;
- Продукты распада должны быть нетоксичными, способными метаболизироваться и выводиться из организма;
- Материал должен обладать соответствующей проницаемостью и технологичностью для предполагаемого применения.

Получаемые в медицине скаффолды/гидрогели должны быть биоразлагаемыми, т.е. полностью или частично разрушаться в организме с

образованием нетоксичных осколков. Эти каркасы должны подвергаться деградации в соответствии со скоростью образования тканей и быть цитосовместимыми с тканями хозяина [153-155]. Деградиционные свойства тканеинженерных каркасов существенно влияют на пролиферацию клеток и регенерацию тканей. Сопоставление скорости разрушения каркаса и формирования регенерированной ткани является ключом к успешной регенерации тканей и органов [156]. Хороший каркас должен сохранять свою структурную целостность и обеспечивать необходимую механическую поддержку до тех пор, пока клетки полностью не адаптируются к окружающей среде и не начнут выделять достаточное количество внеклеточного матрикса для выживания. После периода пролиферации, когда клетки больше не нуждаются в поддержке каркаса, он может быть полностью удалён организмом и заменён новой тканью. Подобные каркасы разрушаются в том числе под действием ферментов организма.

Ферменты представляют собой класс белков, способных катализировать химические реакции путем связывания их с совместимым субстратом [157]. Ферменты обладают специфичным действием, разрывая определенные связи в белках. Процесс расщепления протекает с присоединением воды по месту разрыва связей между отдельными аминокислотами, что является ферментативным гидролизом (схема 5, на примере гидролиза панкреатином и тромбином связи белка, образованной остатками аминокислот аргинина и лизина) [158, 159].



Сам коллаген подвергается ферментативному расщеплению в организме с помощью таких ферментов, как коллагеназы и металлопротеиназы, с образованием соответствующих аминокислот. В результате ферментативного гидролиза не нарушается структура аминокислот и их состав. В работах [160, 161] был изучен процесс

ферментативного гидролиза тромбином и панкреатином трескового и бычьего коллагена и фибриногена, как компонентов клеточных скаффолдов. Показано, что разрушение белков происходит быстро, уже в течение 1 минуты образуется низкомолекулярная фракция с ММ ~10 кДа, ее содержание более 80%. В случае фибриногена гидролиз протекает медленнее, но он также разрушается в течение 3 суток в основном до фракции ММ ~10 кДа.

В чистом виде монобелковые гидрогели редко используются при производстве скаффолдов из-за быстрой деградации и недостаточной механической прочности. Так коллагеновые материалы подвергаются ферментативной деградации в течение 2-24 недель (в зависимости от сшивки) [162]. Чтобы контролировать процесс разложения гидрогеля, между основной цепью биополимера и сопряжёнными реакционноспособными группами можно включить гидролитически разлагаемые группы (например, сложные эфиры). Так, например, гидроксипропанметакрилат был конъюгирован со многими биополимерами, в том числе с декстраном [163] и гиалуроновой кислотой [164], чтобы регулировать процесс деградации гидрогеля. Для увеличения скорости деградации гидрогеля можно добавить несколько групп молочной кислоты. Добавление молочной кислоты может привести к слишком быстрому разложению гидрогелей, что приведет к скоплению клеток и изменению их морфологии [165]. Чтобы избежать этого, вместо молочной кислоты можно использовать капролактон — гидролизуемую группу с более низкой скоростью разложения [166]. Помимо гидролиза как метода деградации, вводят протеазоразлагаемые пептиды между основной цепью гиалуроновой кислоты и метакрилатами, чтобы сформированные гидрогели реагировали на протеазы [166]. С целью уменьшения скорости биорезорбции материалов на основе белков и улучшения механических свойств также часто используют метод ввода синтетического полимера в исходную структуру. Синтез гибридных материалов осуществляют радикальной привитой сополимеризацией синтетического мономера на

природный полимер с использованием как традиционных радикальных инициаторов [167], так и металлоорганических соединений [168-170]. Известно, например, что скаффолды на основе коллагена и акрилатов обладают улучшенными механическими свойствами (прочностью на растяжение, устойчивостью, удлинением на разрыв) и цитосовместимостью [20, 139, 140]. В данной работе были проведены исследования по сравнению ферментативного разрушения исходного морского коллагена и привитых сополимеров на его основе, которые показали уменьшение скорости биорезорбции при введении в состав фрагментов ПММА и модификаторов белковой и полимерной структуры.

1.5. Гетерогенный фотокатализ в синтезе полимерных материалов

Разработка новых подходов к способам получения перспективных материалов с использованием «зеленой химии» является актуальной задачей научных исследований. Концепция «зелёной» химии была сформулирована Полом Анастасом и направлена на разработку более экологичных химических процессов и продуктов. «Зелёная» химия предполагает использование принципов, позволяющих исключить или сократить применение и производство опасных веществ при планировании, производстве и использовании химической продукции [171, 172]. «Зелёная» химия определяется как «подход к синтезу, обработке и использованию химических веществ, который снижает риски для человека и окружающей среды» [173]. «Зелёная» химия — междисциплинарный предмет, требующий активного участия и вклада каждой отрасли науки [174].

Нынешняя тенденция к глобализации в сочетании с растущим спросом на более экологичные химические процессы стимулируют разработку принципов «зелёной» химии [175] и методов, направленных на минимизацию воздействия на окружающую среду при одновременном повышении эффективности промышленного производства [176, 177]. В этом контексте

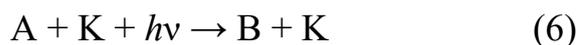
каталитические процессы особенно важны благодаря их высокой селективности, низким энергозатратам и сокращению образования отходов.

Одним из фундаментальных инструментов устойчивого развития современного общества является гетерогенный катализ, который обеспечивает эффективное промышленное производство важнейших химических веществ, энергии и материалов, необходимых для удовлетворения базовых потребностей растущего населения планеты. Роль гетерогенного катализа значительна не только в повышении эффективности промышленности, но и в решении глобальных экологических проблем, поскольку гетерогенные катализаторы эффективно используются в различных процессах восстановления окружающей среды [178].

Применение каталитических реакций в синтезе ещё больше повышает экологичность многих химических процессов [179]. При этом одним из наиболее перспективных направлений исследований в настоящее время является разработка высокоактивных гетерогенных фотокатализаторов (сенсбилизаторов) для осуществления промышленно важных процессов: очистки воды и воздуха от органических веществ; синтеза водорода; окисления органических субстратов (углеводородов и спиртов); восстановления диоксида углерода с получением метана, метанола, муравьиной кислоты; конверсии биомассы; полимеризации и др. Исследование процесса фотокатализа и разработка новых эффективных фотокаталитических систем может привести к решению проблем, связанных с необходимостью замены невозобновляемых источников сырья и энергии на возобновляемые, а также серьезно продвинуться в вопросах снижения концентрации диоксида углерода в атмосфере путем его улавливания и дальнейшего преобразования в ценные продукты.

Гетерогенный фотокатализ – это междисциплинарная область науки, возникшая на стыке фотохимии, гетерогенного катализа, а также, в значительной степени, физики и химии твердого тела. На современном этапе развития науки фотокатализ определяют как «изменение скорости или

возбуждение химических реакций под действием света в присутствии веществ (фотокатализаторов), которые поглощают кванты света и участвуют в химических превращениях участников реакции, многократно вступая с ними в промежуточные взаимодействия и регенерируя свой химический состав после каждого цикла таких взаимодействий» [180, 181]. Процесс фотокаталитического стимулирования химических превращений в общем виде может быть записан в следующем виде:



Необходимым условием для отнесения процесса к фотокатализируемому является неизменность химического состава катализатора K в конце цикла превращений, что отличает фотокаталитические реакции от фотохимических. Необходимость четкого разграничения понятий «фотокатализ» и «фотохимия» вызвана тем фактом, что кванты света при протекании реакции необратимо расходуются, то есть свет нельзя рассматривать в качестве катализатора/фотокатализатора [182].

За последние несколько десятилетий гетерогенный фотокатализ стал всесторонне изучаемой областью из-за его огромного потенциала для решения проблем загрязнения окружающей среды и мирового энергетического кризиса. Являясь экологически чистой технологией, отличающейся уникальными преимуществами работы при комнатной температуре и использованием чистого, возобновляемого солнечного света в качестве движущей силы, гетерогенный фотокатализ продолжает оставаться важным компонентом современной химии в XXI веке. Доступная литература по гетерогенному фотокатализу в основном посвящена о достижениях полупроводника TiO_2 в области разложения загрязняющих веществ в воде и воздухе. Однако недавние исследования доказали, что гетерогенный фотокатализ эффективен и перспективен для многих других реакций, таких как восстановление углекислого газа, фотокаталитическое расщепление воды и органические превращения. Кроме того, отчеты об исследованиях также показали, что для этих фотокаталитических реакций может быть

использовано множество альтернативных полупроводников и фотоактивных органических соединений [183].

Очевидно, что фотокатализатор является одним из наиболее важных компонентов фотокаталитической технологии [184-186]. Хороший фотокатализатор должен обладать рядом превосходных свойств, таких как высокая химическая стабильность, хорошая биосовместимость, низкая стоимость и доступность [187-189]. В дополнение к этому есть ещё два важных свойства: высокая эффективность разделения фотоиндуцированных электронно-дырочных пар и сильная реакция на свет [190, 191].

Механизм реакций с участием сенсбилизаторов включает несколько важных стадий, представленных схемами (7)–(9) и показанных на рис. 5.

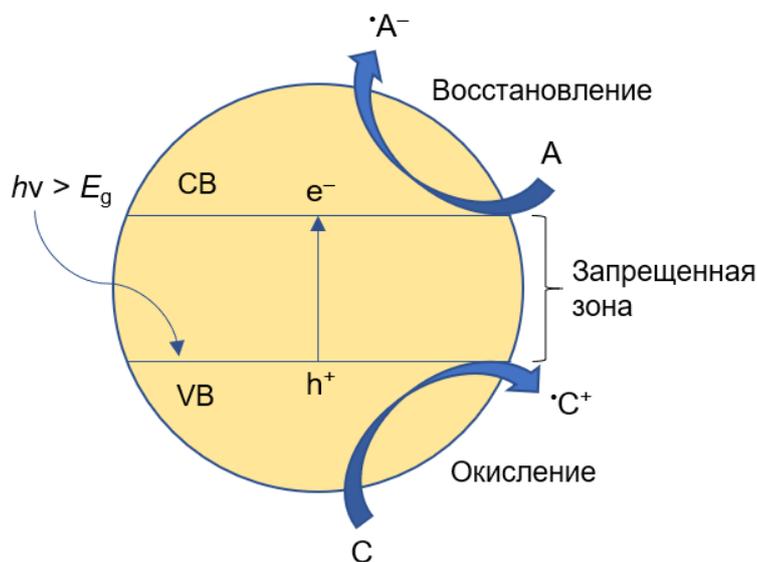
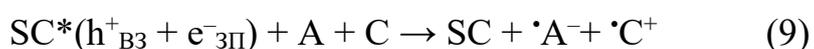
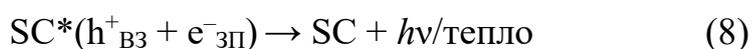
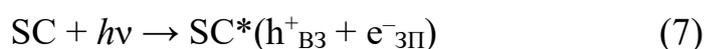


Рис. 5. Упрощенная схема гетерогенного фотокатализа [192, 193]

Энергетический спектр электронов в твердом теле состоит из отдельных разрешенных энергетических зон – зоны проводимости (ЗП) и валентной зоны (ВЗ), которые разделены зонами «запрещенных энергий» [194, 195]. Таким образом, ширина запрещенной зоны fotocувствительного материала определяется как разность энергий дна зоны проводимости и потолка валентной зоны (рис. 5). При поглощении света, энергия которого превышает ширину запрещенной зоны fotocувствительного материала (SC), электрон (e^-) переходит из валентной зоны в зону проводимости, генерирую

таким образом дырку (вакансию, h^+) в валентной зоне (схема 7). Так как в идеальном полупроводнике все состояния валентной зоны заполнены, а все состояния зоны проводимости свободны, то перенос происходит именно в направлении, показанном на рис. 5. Электрон после попадания в зону возбуждения становится подвижным и обладает существенным восстановительным потенциалом. В общем случае такой электрон в случае его переноса на поверхность полупроводника можно рассматривать как сильный одноэлектронный восстановитель. При этом образовавшаяся дырка также является весьма подвижной и является одноэлектронным окислителем [195]. После разделения электрона и дырки происходит либо обратной перенос электрона в валентную зону, приводящий к регенерации полупроводника (схема 8), либо электроно-дырочная пара вступает в окислительно-восстановительные реакции с адсорбированными на поверхности молекулами (схема 9) [196]:



За последние два десятилетия фотокаталитические реакции с использованием видимого света привлекли значительное внимание как экологически безопасные методы синтеза. Использование сенсбилизации видимым светом в качестве средства инициирования органических реакций привлекательно тем, что органические соединения не поглощают видимый свет, что снижает количество побочных реакций, часто возникающих при проведении фотохимических реакций с использованием высокоэнергетического ультрафиолетового излучения [197]. По сравнению с видимым светом энергия ультрафиолетового света выше, но ультрафиолетовый свет составляет всего 5 % солнечного спектра [198]. Несмотря на то, что ранее диоксид титана нашел практическое применение чаще всего в устройствах очистки воды и воздуха [199, 200], он относится к широкозонным полупроводникам, ширина запрещенной зоны которого в

зависимости от способа формирования лежит в диапазоне 3.0–3.4 эВ, что обуславливает интенсивное поглощение им света только в ультрафиолетовой области оптического спектра. С точки зрения эффективного использования солнечной энергии, разработка новых активных фотокатализаторов, способных поглощать видимое излучение являются важными направлениями в теории и практике гетерогенного фотокатализа.

Фотокаталитические комплексы на основе оксидов металлов относятся к экологически чистой альтернативе химических источников активных частиц в превращениях реагентов. Они дают возможность избежать использования в синтезе вспомогательных веществ, сократить число стадий процесса и т.п. Чаще всего проводят фотокаталитическое расщепление воды с образованием водорода [201-205] или разложение органических соединений в водных растворах [206-218]. Использование фотокатализа для получения полимерных материалов мало изучено [219-221], хотя перспективно и интересно. Среди таких сложных оксидов выделяют несколько наиболее представительных рядов соединений на основе устойчивых структурных типов минералов: перовскита, флюорита, пироклора, корунда, рутила и др. Кристаллическая структура таких соединений построена из полиэдрического металл-кислородного каркаса, в полостях которого располагаются низкозарядные катионы. Таким образом, исследователи, меняя элементный состав с сохранением общей кристаллической структуры, управляют различными полезными свойствами соединений [222].

Наибольшее количество научных работ посвящено веществам со структурой перовскита и производным от неё. Вместе с тем, не меньший научный интерес представляет структурный тип минерала пироклора $(Ca,Na)_2Nb_2O_6F$ [223]. Структура идеального α -пироклора имеет стехиометрию AM_2X_6X' (А – большой низкозарядный катион, М – маленький высокозарядный катион, X – ионы O^{2-} и OH^- , F^- , или молекулы H_2O , X' – слабосвязанные ионы). При снижении количества анионов X' формируются

дефектные пироксиды с общей формулой $A_{2-x}B_2X_6X'_{1-y}$. Последний член данного ряда называется β -пироксидом с общей формулой AB_2X_6 .

Как показывают исследования, некоторые соединения со структурой пироксидов проявляют фотокаталитическую активность и даже выступают в качестве многообещающих объектов для фотокатализа. Например, авторами [224] было показано, что разложение воды происходит более эффективно с использованием кубического пироксидов $AgSbO_3$, по сравнению с WO_3 . Среди фаз со структурой β -пироксидов фотокаталитическое разложение воды способны вызывать соединения $A^I M^V WO_6$ ($A^I = K, Rb, Cs$; $M^V = Nb, Ta$) [225], а разложение органических соединений – $CsTeMoO_6$, $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$, $(Rb/Cs)NbTeO_6$ [226, 227].

В результате облучения сложных оксидов структуры β -пироксидов видимым светом в водной среде образуются активные частицы разной природы: заряженные частицы, радикалы, синглетный кислород, пероксид водорода, способные к разрушению органических соединений [206-218]. Активные формы кислорода (АФК) включают ионы кислорода, свободные радикалы (небольшие молекулы с исключительной реактивностью благодаря наличию неспаренного электрона на внешнем электронном уровне) и перекиси как неорганического, так и органического происхождения [193, 228]. Выделяют четыре главных АФК, которые могут образоваться и вступать в дальнейшие превращения в ходе фотокаталитического процесса: супероксидный радикал $\cdot O_2^-$, пероксид водорода H_2O_2 , синглетный кислород 1O_2 и гидроксильный радикал $\cdot OH$. Следует отметить, что в реакционной массе также возможно присутствие и генерирование радикалов органических пероксидов $ROO\cdot$, нитрозил-радикала $\cdot NO$ и озона O_3 . Образование и обнаружение трех последних АФК зависит главным образом от типа фотокаталитической реакции и выбора условий проведения процесса.

Сложный оксид $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ принадлежит к структурному типу β -пироксидов и имеет линию поглощения в диапазоне видимого света ~ 493 нм (2.51 эВ - голубой свет) [213]. Ранее было показано [213], что при облучении

катализатора - оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ видимым светом, образуются электро-дырочные пары, которые могут приводить к ряду превращений по схемам 1-7 на рис. 6:

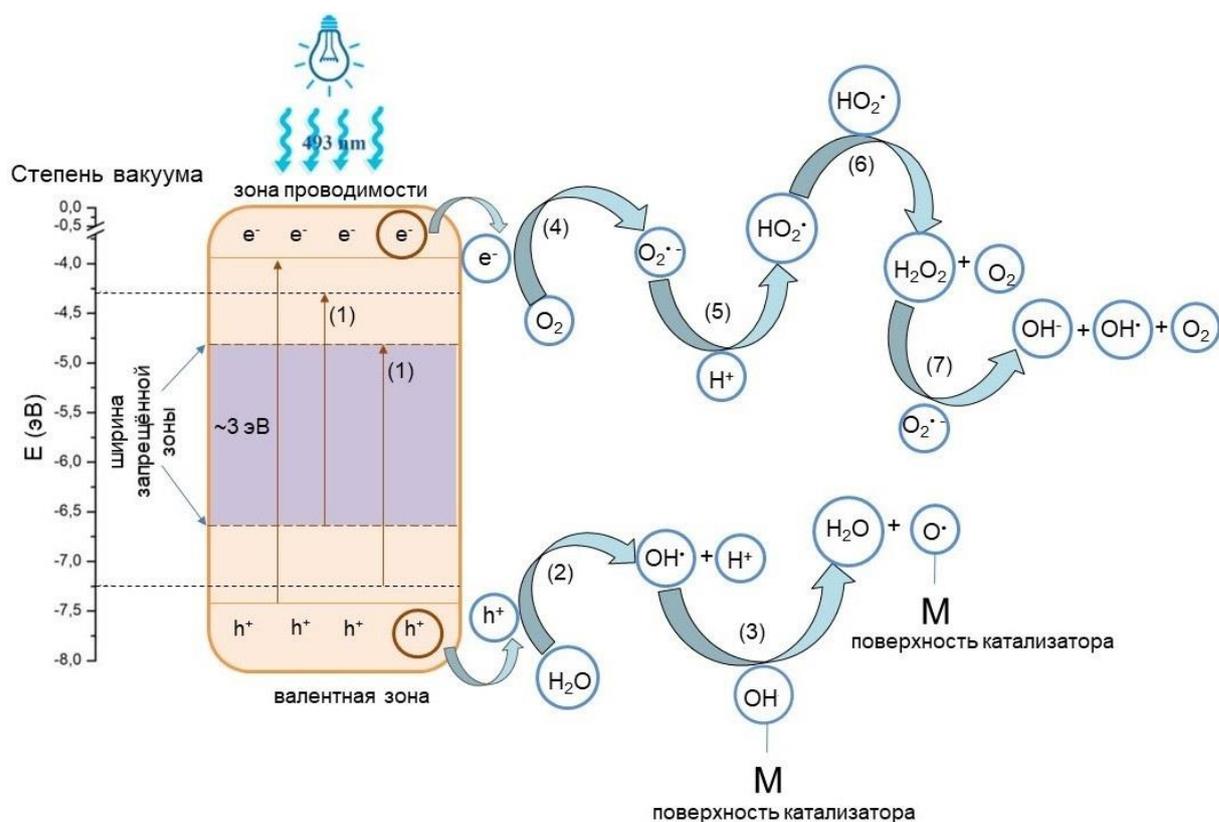


Рис. 6. Схема образования электронно-дырочных пар при фотокатализе [229, 230]

Реакции (1)-(7) на рис. 6 свидетельствуют о том, что фактически одновременно в реакционной смеси фотокатализатора и мономера могут параллельно протекать несколько химических реакций. Реализация той или иной химической реакции определяется её кинетическими параметрами и концентрацией реагирующих частиц. Достаточно привлекательно использование активного гидроксильного радикала, также образующегося в каскаде указанных превращений, для инициирования радикальных процессов в водной среде при получении, в частности, новых полимерных материалов по целому ряду причин: возможности осуществления процесса при комнатной температуре, отсутствие осколков вещественных инициаторов органической природы в конечном продукте и т.д. Образование $\text{OH}\cdot$

радикалов, активных в радикальной полимеризации, происходит в этом случае как при взаимодействии с адсорбированными на поверхности молекулами воды, так и в объеме раствора (рис. 6, схема 2, 3), а также при восстановлении растворенного в воде кислорода (рис. 6, схема 4-7). Гидроксильный радикал характеризуется наибольшей реакционной способностью из всех АФК, способен взаимодействовать с большинством органических молекул и рассматривается в качестве наиболее эффективного окислителя не только для разложения органических красителей [228], но и для других фотокаталитических процессов [231].

В заключение главы, посвященной обзору известных литературных данных по проблеме диссертации, хотелось бы отметить следующее. Приведенные в обзоре данные свидетельствуют о стремительном развитии возможностей макромолекулярного дизайна полимерных материалов, что позволяет моделировать условия на стадии синтеза с целью получения материалов с желаемыми свойствами. Исследования, представленные в данной диссертации, связанные с получением и характеризацией трехмерных структур для медицинских целей с использованием гетерогенного фотокатализа в присутствии сложных оксидов под действием видимого света для радикального инициирования привитой сополимеризации MMA на ТК при варьировании состава исходной реакционной смеси путем введения известных модифицирующих добавок, начаты в 2020 году и продолжают развиваться. Следует также указать, что аналогичные исследования с использованием в качестве инициатора окислительно-восстановительных систем на основе триалкилборанов проводятся также с 2020 г. Они опубликованы в рецензируемых журналах [170, 232-234]. Часть этих исследований легла в основу диссертации Лобановой К.С. «Синтез сополимеров коллагена и (мет)акриловых мономеров в присутствии борорганических соединений», которая была успешно защищена в 2025 г.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Материалы и реактивы

Использовались коммерческие реагенты: уксусная кислота (ХЧ, Лега, Россия), гидроксид натрия NaOH (ЧДА, Реахим, Россия), хлорид кальция CaCl₂ (Ч, Химреактив, Россия), АК (ЧДА, Sigma Aldrich, США), ТГМ-3 (Химтранзит, Россия), ГА (50%, Русхим, Россия), дейтерированный хлороформ CDCl₃ (99,8%, Acros Organics, США), толуол (ОСЧ, Экос-1, Россия), петролейный эфир (70/100, Компонент-Реактив, Россия), эмульгатор Эдискан (Оргхим, Россия) - калиевые соли смоляных и жирных кислот и ПЭГ (ММ 4000 и 6000, Норкем, Россия) использовали без предварительной очистки.

В качестве мономера использовали ММА (99%, Sigma Aldrich, США): его очищали от стабилизатора путем последовательной промывки 10% водным раствором NaOH и холодной водой до достижения нейтрального pH. Затем высушивали с использованием CaCl₂ и перегнан в вакууме (1,33 Па) при температуре 40°C.

Тетрагидрофуран (ТГФ) очищали от перекисей выдерживанием в течение суток и последующим кипячением в присутствии твердого NaOH в течение нескольких часов и последующей перегонкой. Хлороформ CHCl₃ (99,85%, Компонент-Реагент, Россия) и гексан (ХЧ, Купавнареактив, Россия) очищали перегонкой.

В качестве ферментов использовали коммерческие препараты тромбин (Ренам, Россия), трипсин (ПанЭко, Россия) и панкреатин (Hubei Maxpharm Industries CO., LTD, Китай).

2.2. Выделение высокомолекулярного трескового коллагена/желатина и их характеристика

ТК выделяли по методу, описанному в [235], путем экстракции 3%-ным раствором уксусной кислоты измельченной и промытой в воде тресковой кожи в течение суток при комнатной температуре (соотношение сырья и

раствора уксусной кислоты по массе 1:2). В случае повышенной зольности у исходной шкуры трески выделение осуществляли согласно методу [236], вводя стадию замачивания сырья в 3%-ном растворе соляной кислоты в соотношении 1:1. ТЖ получали таким же образом, но заменили стадию выделения при комнатной температуре термостатированием при 50°C в течение 5 часов при постоянном перемешивании. Полученную дисперсию отфильтровывали через бумажный фильтр. Методом ГПХ была определена молекулярная масса (ММ) выделенного ТК и ТЖ. Она составила ~300 кДа для ТК и ~350 кДа для ТЖ, что соответствует высокомолекулярному белку. Для проведения синтезов коллаген высушивали в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы (1,33 Па) при 50°C и затем готовили необходимую концентрацию раствора коллагена путем растворения белка в дистиллированной воде. По данным элементного анализа состав коллагена: С 43-47%, Н 6-7%, N 16-18%, S <0.3-0,75%. Зольность и кинематическая вязкость белков определяли по ГОСТу [237, 238]. Динамическая вязкость образцов рассчитывали по формуле 10:

$$\eta = k\tau\rho \quad (10)$$

где η – динамическая вязкость, мПа*с;

k – постоянная вискозиметра;

τ – время истечение, с;

ρ – плотность раствора, г/см³ (для 10% водного раствора ТК и ТЖ при 40 °С плотность принимается равной 1,025 г/см³).

2.3. Синтез сложных оксидов – фотокатализаторов

Все сложные оксиды были получены сотрудниками лаборатории неорганических материалов НИИ Химии ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Все использованные реагенты производства Вектон, Россия (99%).

Соединения $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, CsTeMoO_6 , $\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.37}\text{O}_6$ получали методом твердофазной реакции [213, 226, 239]: исходные реактивы RbNO_3 , TeO_2 и WO_3 для $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, CsNO_3 , TeO_2 и MoO_3 для CsTeMoO_6 , CsNO_3 ,

TeO_3 и V_2O_5 для $\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.375}\text{O}_6$ перемешивали, перетирали в агатовой ступке и спекали при температуре 700°C в течение 1 суток в платиновом тигле. Затем расплав быстро охлаждали, чтобы предотвратить попадание примесной фазы.

Соединения $(\text{Na/K})\text{VMoO}_6$ получали методом золь-гель из водорастворимых реагентов: Na_2CO_3 , KNO_3 , NH_4VO_3 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и лимонная кислота (ЛК). Реагенты растворяли в 50 мл дистиллированной воды. К вышеуказанному раствору добавляли ЛК при соотношении ионов металл : ЛК = 1:2. Реакционная смесь нагревали при 80°C в течение 1 часа, а затем добавляли этиленгликоль (ЭГ) в соотношении ЛК:ЭГ=1:1. Смесь нагревали до 200°C , чтобы получился твердый порошок. Конечные порошки получали последующим отжигом в печи при 550°C образовавшегося золя [240]. Подготовленные образцы порошков измельчали в планетарной мельнице в течение ~16-18 ч со скоростью 30 об/мин для получения частиц минимального размера.

Синтез сложных оксидов ANbTeO_6 ($\text{A} = \text{Rb}, \text{Cs}$) проводили твердофазным методом [241]. Стехиометрические количества RbNO_3 или CsNO_3 измельчали с Nb_2O_5 и TeO_2 в агатовой ступке и помещали в фарфоровый тигель. Полученные смеси подвергали отжигу при 700°C в течение 24 ч со скоростью нагрева $5^\circ\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$. После этого образцы измельчали в планетарной мельнице в течение 18 ч в среде изопропилового спирта. После измельчения образцы высушивали при 80°C в течение 12 ч.

Синтез β -пирохлоров $\text{CsM}_{0.25}\text{W}_{1.75}\text{O}_6$ ($\text{M} = \text{Ni}, \text{Co}, \text{Mn}, \text{Cu}$) проводили твердофазным методом [242]. Реактивы NiCO_3 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, MnCO_3 , CuCO_3 , CsNO_3 и WO_3 измельчали в агатовой ступке и помещали в фарфоровый тигель. Смесь выдерживали в течение 20 ч при температуре 900°C со скоростью нагрева $5^\circ\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$. Далее образцы измельчали в планетарной мельнице в течение 16 ч в среде этилового спирта. После измельчения образцы высушивали при 90°C в течение 8 ч.

Соединения Bi_2WO_6 и Bi_2MoO_6 синтезировали гидротермальным методом [243]. Исходные соединения $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ предварительно перемешивали в стехиометрических количествах в дистиллированной воде в течение 1 ч, после чего помещали в реактор-автоклав и выдерживали при температуре 160°C в течение 12 ч. Полученные порошки отмывали несколько раз этанолом и водой, центрифугировали и высушивали при температуре 80°C в течение 12 ч.

2.4. Полимеризация MMA в воде в условиях гетерогенного фотокатализа

Эмульсия MMA в воде получали путем смешивания порошкообразных сложных оксидов и жидких компонентов. Вода и мономер использовали в объемном соотношении 75:25 с добавлением эмульгаторов Эдискан и ТГМ-3, соотношение эмульсия : катализатор = 100:1. В случае полимеризации MMA в присутствии Bi_2MoO_6 в качестве растворителя мономера использовали гексан. Готовая эмульсия обрабатывали с помощью ультразвукового низкочастотного диспергатора (УЗДН) в течение 5 минут. Перед началом реакции эмульсию барботировали аргоном в течение 15 минут при перемешивании. Реакцию проводили в атмосфере аргона в течение 5 часов при постоянном перемешивании (600 об/мин) при облучении с использованием светодиодной лампы видимого света (LED, 30 Вт). Затем эмульсию центрифугировали при 4000 об/мин для отделения катализатора после реакции и разделяли на фазы в делительной воронке. Органический слой высаживали избытком петролейного эфира, выпавший осадок отделяли декантацией и высушивали, затем растворяли в необходимом растворителе для исследования его характеристик.

2.5. Синтез привитых сополимеров на основе коллагена/желатина в условиях гетерогенного фотокатализа

Синтез сополимера коллаген/желатин-ПММА. Эмульсию получали путем смешивания порошка оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ и жидких компонентов:

вода, коллаген/желатин, ММА в объемном соотношении 70:5:25 с добавлением стабилизаторов эмульсии Эдискан и ТГМ-3, соотношение эмульсия : катализатор = 100:1. Готовую эмульсию обрабатывали с помощью УЗДН в течение 5 минут. Перед началом реакции эмульсию барботировали аргоном в течение 15 минут при перемешивании. Реакцию проводили в атмосфере аргона в течение 5 часов при постоянном перемешивании (600 об/мин) при облучении с использованием светодиодной лампы видимого света (LED, 30 Вт). Затем эмульсию центрифугировали при 4000 об/мин для отделения катализатора после реакции, затем органическую фазу эмульсии экстрагировали толуолом, а водную фазу отделяли и подготавливали для дальнейших исследований характеристик.

Синтез сополимера ТКС-1. Эмульсию получали путем смешивания жидких компонентов (ТК:ММА:ТГМ-3:АК:вода = 4,34:4,34:0,03:4,34:86,95 масс.%) и сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ в соотношении эмульсия: катализатор = 180:1. Перед началом реакции эмульсию барботировали аргоном в течение 15 минут при перемешивании. Реакцию проводили в атмосфере аргона в течение 5 часов при постоянном перемешивании (600 об/мин) при облучении с использованием светодиодной лампы видимого света (LED, 30 Вт). Затем эмульсию центрифугировали при 4000 об/мин для отделения катализатора после реакции. После синтеза разделяли органическую и водную фазы.

Синтез сополимера ТКС-2. Эмульсию получали путем смешивания жидких компонентов (ТК:ММА:ТГМ-3:АК:вода = 8,00:6,00:0,05:6,00:79,95 масс%) и сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ в соотношении эмульсия: катализатор = 180:1. Перед началом реакции эмульсию барботировали аргоном в течение 15 минут при перемешивании. Реакцию проводили в атмосфере аргона в течение 5 часов при постоянном перемешивании (600 об/мин) при облучении с использованием светодиодной лампы видимого света (LED, 30 Вт). Затем эмульсию центрифугировали при 4000 об/мин для

отделения катализатора после реакции. После синтеза разделяли органическую и водную фазы.

Синтез сополимера ТКС-3. Эмульсию получали путем смешивания жидких компонентов (ТК:ММА:ТГМ-3:АК:ПЭГ:вода=7,7:3,80:0,05:3,80:7,7:76,95 масс. %) и сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ в соотношении эмульсия: катализатор = 180:1. Перед началом реакции эмульсию барботировали аргоном в течение 15 минут при перемешивании. Реакцию проводили в атмосфере аргона в течение 5 часов при постоянном перемешивании (600 об/мин) при облучении с использованием светодиодной лампы видимого света (LED, 30 Вт). Затем эмульсию центрифугировали при 4000 об/мин для отделения катализатора после реакции. После синтеза разделяли органическую и водную фазы. Водная фаза синтеза при добавлении раствора щелочи до $pH \sim 7$ коагулировала.

Синтез сополимера ТКС-С и ТКС-Г. Образец ТКС-С получали многократной обработкой ледяным этиловым спиртом образца сополимера ТКС-3 в воронке с последующим высушиванием в вакуумном шкафу (1,33Па) до постоянной массы при 50°C. Образец ТКС-Г получали путем введения в состав исходной реакционной смеси ТКС-3 5%-ного водного раствора глутарового альдегида в токе аргона (соотношении эмульсия : ГА = 3,5:1) и выдерживания при комнатной температуре. Полученный сшитый сополимер ТКС-Г высушивали в вакуумном шкафу (1,33Па) до постоянной массы при 50°C.

2.6. Подготовка образцов к проведению анализов

Лиофилизация. Образцы исходных белков, их сополимеров и гидрогели на их основе замораживали в жидком азоте (-196°C) в течение нескольких минут. Замороженные образцы сушили в вакууме в течение 3 часов до полного высыхания при периодическом подмораживании.

Экстракция. Для очистки высушенного сополимера ТКС-3 от остатков непрореагировавших синтетических компонентов и для смывания полимера с

поверхности катализаторов после полимеризации использовали длительную экстракцию образцов хлороформом (10-15 часов) в экстракторе Сокслета.

Очистка катализаторов. После проведения реакций все порошки сложных оксидов отделяли от реакционной смеси центрифугированием (4000 об/мин), промывали в воде 3 раза по 20 минут при 50°C и высушивали до постоянной массы. С целью исследования возможности повторного использования катализаторов сложный оксид $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ после полимеризации очищали различными способами (для каждого способа была использована своя порция катализатора):

- 1) промывали при 50°C в растворе ТГФ в течение 3 часов при постоянном перемешивании (500 об/мин);
- 2) проводили экстракцию хлороформом при температуре 61°C в экстракторе Сокслета в течение 15 часов;
- 3) обрабатывали ультразвуком в течение 40 минут в присутствии воды при температуре 20°C;
- 4) нагревали при температуре 300-400°C в платиновом тигле в муфельной печи.

Затем все влажные порошки высушивали в вакуумном шкафу при температуре 40°C до постоянной массы.

Выделение синтетических полимеров. Синтетический полимер, образовавшийся в результате фотокатализа, выделяли осаждением большим избытком петролейного эфира из органической фазы синтеза, а также в результате экстракции хлороформом в экстракторе Сокслета порошков сложных оксидов после проведения полимеризации. Растворитель удаляли, а полимер высушивали для дальнейших исследований.

2.7. Инструментальные методы исследования

ГПХ. Определение молекулярно-массовых характеристик коллагена и водных растворов привитых сополимеров проводили методом ГПХ. Перед проведением анализа все образцы фильтровали через шприцевой фильтр с

диаметром пор 0,45 мкм. Растворы анализировали с использованием высокопроизводительного жидкостного хроматографа «Shimadzu CTO 20A/20A C» (Япония). Разделение проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSK Gel G3000SWX1 с диаметром пор 5 мкм и низкотемпературного детектора рассеяния света ELSD-LT II. Элюентом служил 0.5 М раствор уксусной кислоты, скорость потока составляла 0.8 мл•мин⁻¹, для калибровки использовали узкодисперсные стандарты декстрана с диапазоном молекулярной массы 1-410 кДа («Fluca»).

Молекулярно-массовые характеристики органических растворов полимеров определяли методом ГПХ в ТГФ с помощью жидкостного хроматографа “Shimadzu Prominence LC-20VP” с колонками “Tosoh Bioscience”, (скорость потока элюента 0.7 мл/мин), для калибровки применяли узкодисперсные стандарты полистирола, в качестве детектора использовали дифференциальный рефрактометр.

CHNS-элементный анализ. Анализ высушенных до постоянной массы образцов сополимеров и коллагена/желатина осуществляли CHNS(O) методом на элементном анализаторе «vario EL cube» для одновременного определения CHNS. Оценку прививки MMA на коллаген осуществляли по изменению количества азота в образцах водных фаз синтезов по сравнению с исходным ТК/ТЖ.

РМА. Элементный анализ сложных оксидов и полимеров на их поверхности проводили с помощью анализатора с детектором X-MaxN 20 (Oxford Instruments, UK) по ХРИ линиям K α (O, C, V, K, Na) и L α (Rb, Cs, Nb, Te, W, Mo, Bi, Cu, Co, Mn, Ni).

СЭМ. Исследование поверхности сложных оксидов и морфологии исходных белков, привитых сополимеров и гелей на их основе проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-IT 300 (Jeol ltd, Япония) с диаметром электронного зонда 5 нм (рабочее напряжение 20 кВ), используя детекторы низкоэнергетических вторичных электронов и

электронов обратного рассеяния в режиме низкого вакуума чтобы избежать зарядки образцов.

ЯМР-спектроскопия. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C образцов полимеров в растворе CDCl_3 были записаны на спектрометрах Agilent DD2 400 МГц и Bruker Avance II 400 МГц. В качестве эталона использовали сигналы CHCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.26$ м.д.) и CDCl_3 ($\delta_{\text{C}} = 77.16$ м.д.). Интерпретацию результатов осуществляли с помощью д.х.н. Курского Ю.А.

ИК-спектроскопия. Спектры поглощения регистрировались с помощью спектрофотометра “IRPrestige-21” (Shimadzu, Япония), диапазон волновых чисел составлял 5500-550 cm^{-1} , а погрешность не превышала $\pm 0,05$ cm^{-1} . Полимерные пленки были получены на отражающей пластине KBr.

МАЛДИ. Масс-спектрометрический анализ был проведен с помощью времяпролетного масс-спектрометра Axima Perfomance с источником МАЛДИ, оснащенного азотным лазером (337 нм) в режиме детектирования положительных ионов с использованием рефлектрона. Ионы были детектированы в диапазоне m/z от 1-500 кДа. Для накопления масс-спектров мощность лазерного излучения была установлена на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца. Масс-спектры были зарегистрированы при помощи программы Launchpad 2.9 MALDI-MS Shimadzu Biotech (Shimadzu, Япония). Калибровка была проведена по масс-спектру матрицы α -циано-4-гидроксикоричная кислота.

На мишень наносили по 1 мкл смеси матрицы (20 мг/мл в ТГФ) и исследуемого образца (1 мг/мл в ТГФ) в соотношении 1:1. Образцы были высушены при комнатной температуре на воздухе. Полученную смесь наносили на 10 ячеек планшета, для каждой из которых был записан спектр, полученный в результате суммирования 100 серий спектров по 20 импульсов лазера для каждой.

РФЭС. Анализ был проведен сотрудниками ресурсного центра «Физические методы исследования поверхности» СПбГУ. Определение особенностей химического состава поверхности в образцах сложных оксидов

проводили на электронном спектрометре “Escalab 250Xi”. В качестве источника излучения использовалась монохроматизированная линия Al K α =1486.6 эВ. Спектры были записаны в режиме постоянной энергии пропускания при 100 эВ для обзорного спектра и 50 эВ для спектров регионов элементов с размером пятна 650 мкм. Глубина анализа поверхности – до 2 нм. Полное разрешение по энергии составляло около 0,3 эВ. Для нейтрализации заряда поверхности использовался газ-нейтрализатор. Давление в камере при исследовании было не более 10⁻⁹ мбар, что гарантировало чистую поверхность. Корректировку положения линий элементов во всех случаях проводили по линии углерода C 1s (285эВ). Исследование состава поверхности по глубине проводилось при помощи травления поверхности ионной пушкой (Ar⁺) с ускоряющим напряжением 3 кВ.

ПГХ. Метод ПГХ был проведен с использованием хромато-масс-спектрометра GCMSQP2010 Ultra (Shimadzu, США) с помощью пиролитической приставки EGA/PY-3030D (FrontierLaboratoriesLtd., Япония). Обработка результатов хромато-масс-спектрометрического анализа была проведена с использованием фирменного программного обеспечения Shimadzu (GCMSSolutionver. 4.11), идентификация полимеров была проведена с помощью базы данных NIST 11 (The National Institute of Standards and Technology, U.S. Department of Commerce) и базы данных продуктов пиролиза F-Searchver. 3.4 от компании Frontier Laboratories Ltd (содержит сведения о продуктах распада 1314 полимеров).

2.8. Методы исследования биомедицинских характеристик

Ферментативный гидролиз. Гидролиз исходного ТК для оценки влияния природы и концентрации фермента проводили для 1%-ного водного раствора при комнатной температуре при pH~7.0. Использовали протеолитические ферменты панкреатин, тромбин и трипсин при трех фермент-субстратных соотношениях коллаген : фермент (10:1, 10²:1, 10³:1).

Через определенные промежутки времени с целью изучения молекулярно-массовых характеристик брали пробы смеси и для прекращения реакции в ней добавляли 4% раствор уксусной кислоты в объемном соотношении 1:1. Для сравнения протекания ферментативного разрушения ТК И ТЖ гидролиз проводили в аналогичных условиях тромбином при соотношении белок : тромбин = 10^3 :1. Реакцию останавливали через 3 суток.

Ферментативный гидролиз привитых сополимеров коллаген–ПММА, ТКС-1 и ТКС-3 панкреатином проводили в аналогичных условиях в течение 3-х суток при фермент-субстратном соотношении коллаген : фермент = 10^3 :1. В случае ТКС-3 после 3 суток гидролиза был получен образец ТКС-Ф, высушенный до постоянной массы в вакууме при 50°C.

Устойчивость гидрогелей. Испытания образцов сополимеров ТКС-3, ТКС-С и ТКС-Г на структурную устойчивость проводили путем их центрифугирования (4300 об/мин) в течение 30 минут при комнатной температуре в буферных растворах с рН 6.8 и 7.2. Оценивали форму образцов визуально [244].

Влагопоглощение гидрогелей. Влагопоглощение образца ТКС-Г, высушенных в шкафу при нагревании, проводили согласно методике [245], в установке, представленной на рисунке 7.

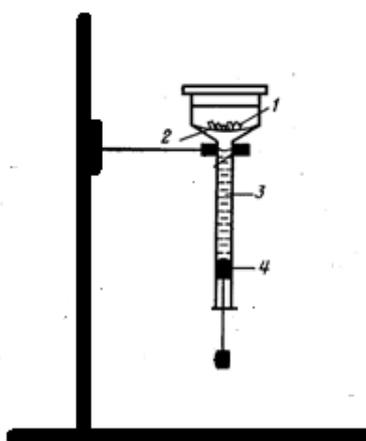


Рис. 7. Установка для определения влагопоглощения гидрогелей (сухих форм): 1 – образец на мелкопористой сетке, 2 – воронка, 3 – калибровочный цилиндр, 4 – поршень

Небольшой кусочек высушенного и взвешенного образца помещали в воронку, соединенную с калиброванным цилиндром, заканчивающимся поршнем. В воронку при крайнем верхнем положении поршня наливали воду в определенном количестве, превышающем ожидаемое количество воды для набухания геля. После начала испытания периодически поршень опускали до тех пор, пока воды в воронке не останется. Количество воды в цилиндре измеряли и, вычитая это количество из первоначально взятого количества воды, была рассчитана поглощенная образцом вода.

Грибостойкость сополимеров. Исследование было проведено сотрудниками лаборатории микробиологического анализа НИИХ ННГУ. Высушенные до постоянной массы пленки полимерных материалов коллаген–ПММА, ТКС-3, ТКС-Г испытывали на грибостойкость по ГОСТу [246]. В качестве тест-культур использовали микроскопические грибы активные деструкторы полимерных материалов: *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium cyclopium*, *Trichoderma viride*. Образцы помещали в чашки Петри, затем поверхность образцов инокулировалась суспензией спор микромицетов, и чашки Петри с образцами помещали в термостат. Продолжительность испытаний – 28 суток при температуре $29\pm 2^\circ\text{C}$ и влажности более 90%.

Таблица 2. Оценка грибостойкости образцов

Балл	Характеристика балла
0	Под микроскопом прорастания спор и конидий не обнаружено
1	Под микроскопом видны проросшие споры и незначительно развитый мицелий
2	Под микроскопом виден развитый мицелий, возможно спороношение
3	Невооруженным глазом мицелий и (или) спороношение едва видны, но отчетливо видны под микроскопом
4	Невооруженным глазом отчетливо видно развитие грибов, покрывающих менее 25 % испытываемой поверхности
5	Невооруженным глазом отчетливо видно развитие грибов, покрывающих более 25 % испытываемой поверхности

По истечении времени испытаний грибостойкость образцов оценивали по 6-балльной шкале (табл. 2): учитывались площадь биообрастания и степень развития микромицетов на образцах.

Исследование цитотоксичности in vitro – МТТ-тест был проведен сотрудниками лаборатории клеточных технологий ПИМУ. С целью оценки цитотоксичности образцов гидрогелей проводили МТТ-тест. В стандартах ISO 10993-5:2009 (Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity) регламентируется проведение доклинических исследований на цитотоксичность in vitro и в качестве одного из основных рекомендуемых методов позиционируется МТТ-тест. МТТ-тест представляет собой колориметрический количественный тест, используемый для измерения метаболической активности и жизнеспособности клеток. Метод основан на реакции восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия бромида (МТТ) до пурпурного формазана внутри живых клеток. Степень восстановления МТТ зависит от метаболической активности НАДФ-Н-зависимых ферментов оксидоредуктазы; соответственно, живые и активно делящиеся клетки ДФЧ демонстрируют высокую степень восстановления МТТ, тогда как ДФЧ, которые токсически повреждены (низкая метаболическая активность) или мертвы, демонстрируют низкую степень восстановления МТТ.

Диметилсульфоксид (ДМСО) добавляется в качестве растворителя для получения окрашенных растворов, поскольку он уменьшает количество внутриклеточных кристаллов формазана. Интенсивность окраски тестируемых образцов после добавления ДМСО количественно измеряли при длине волны 540 нм с использованием планшетного считывателя.

Образцы ТКС-3, ТКС-Г, ТКС-Ф высушивали в вакуумном шкафу до постоянной массы при 50°C. Для получения экстракта испытуемые образцы помещали в ростовую среду ДМЕМ/F12 с добавлением антибиотиков и 2% телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС) и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 24 часов при 37°C и 5% CO₂. После получения экстрактов их

стерилизовали фильтрованием через фильтры 0,22 мкм. Одновременно с началом экстракции клетки тестовой культуры – ДФЧ высевали с концентрацией клеток 100 тыс. кл/мл на лунки 96-луночного планшета в полной ростовой среде (среда DMEM/F12 с добавлением антибиотиков пенициллин/стрептомицин, глутамин и 10% ТЭС) и культивировали в CO₂-инкубаторе в течение 24 часов. Культуры были получены и охарактеризованы в лаборатории биотехнологий ПИМУ Минздрава России. Получение и использование биологического материала для исследования было одобрено локальным Этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России от 30 июня 2023 г., протокол № 9. Использовали активные, морфологически однородные 5–6 пассажные культуры с клетками, хорошо прикрепляющиеся к пластику. Иммунофенотип культуральных клеток соответствовал иммунофенотипу мезенхимальных клеток и жизнеспособность культуры составляла от 95 до 98%. Культура ДФЧ, использованная в этом исследовании, ранее была проверена на стерильность и инфекцию.

Для анализа МТТ полученные экстракты разводили и использовали в следующих пропорциях: контроль 0:1, экстракт 1:0, при дальнейших разведениях экстракт : среда = 1:1; 1:2; 1:4 и 1:8. После чего экстракты и их разведения раскапывали на подготовленную тестовую культуру в плоскодонном 96-луночном планшете, на 8 лунок планшета каждый. Через 72 часа культивирования с экстрактами оценивали состояние культуры на поверхности опытных и контрольных лунок. Для оценки состояния клеточных культур использовали инвертированный микроскоп «Leica DM II» (Leica Microsystems, Германия, программное обеспечение LAS v.4.3), который оборудован видеокамерой и программой визуализации изображений «Leica IM 1000». Для визуальной оценки монослоя использовали увеличение 4x и 10x, а для исследования морфологического и функционального состояния клеток увеличение 10x, 20x и метод фазового контраста. Затем в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ и помещали в CO₂-

инкубатор ещё на 3 часа. После чего супернатант отбирали, замещали на равный объем раствора ДМСО и регистрировали оптическую плотность (ОП) при 540 нм на анализаторе INFINITI F50, Tecan photometer (Tecan Austria GmbH, Австрия). Цитотоксичность суточного экстракта и его разведений в сравнении с контрольными образцами оценивали по относительной интенсивности роста (ОИР) клеток тестовой культуры (формула 11).

$$\text{ОИР(\%)} = \frac{\text{средняя ОП в опытной серии}}{\text{средняя ОП в контроле}} \times 100 \quad (11)$$

Для оценки цитотоксичности выделяли следующие ранги: ранг 0 (ОИР = 100%) и ранг 1 (ОИР = 99-70%) – соответствуют отсутствию цитотоксичности, ранг 2 (ОИР = 69-50%) – соответствует легкой степени цитотоксичности, ранг 3 (ОИР = 49-25%) – средней степени, ранг 4 (ОИР = 24-1%) и ранг 5 (ОИР = 0%) – выраженной цитотоксичности.

Исследование репарации ожоговых ран на крысах. Эксперимент был выполнен сотрудниками кафедры биохимии и биотехнологии ИББМ ННГУ. Методом налива на поверхность стекла, смоченную силиконовой жидкостью, получали образцы ТКС-Г в виде пластин-губок размером ~ 3*3 см, толщиной 1-5 мм. После высушивания гелей в вакуумном сушильном шкафу с целью удаления остаточных органических компонентов пластины-губки были замочены в дистиллированной воде и хранились в ней.

Исследования соответствовали Хельсинской декларации (2000). Эксперимент на животных проводили с соблюдением принципов гуманности, согласно директивам Европейского сообщества (№86/609/ЕЕС, Страсбург, 1986). Эксперимент проводили на 30 крысах-самцах линии Wistar массой 250-300 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, согласно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ» [247].

Перед постановкой эксперимента животных выдерживали в карантине в течение 14 суток на стандартном пищевом и водном рационах при

естественном освещении и температуре воздуха в интервале 18-22°C, в соответствии с «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник», утвержденными приказами МЗ СССР № 1045 от 6.04.73, №1179 от 10.10.83 г. По окончании карантина проводили общую оценку физиологического состояния крыс по виду слизистых оболочек, уровню двигательной активности и потреблению корма и воды. Ко времени проведения исследования все животные были здоровыми, без изменений аппетита, поведения, режима сна и бодрствования.

Крыс разделили на 3 равные по численности группы с использованием способа рандомизации – таблицы случайных чисел. Первая группа (контроль 1) включала крыс со спонтанным течением раневого процесса без лечения, местных аппликаций не проводили. Крысам второй группы (контроль 2) на раневую поверхность накладывали коммерческое коллагеновое раневое покрытие (Зеленая дубрава, Россия). Крысам третьей группы (опыт 1) на область поражения накладывали опытное покрытие – пластина-губка ТКС-Г.

Крысам всех групп нанесли термический ожог кожи. Контактную термическую травму II степени площадью 10% поверхности тела наносили контактно с помощью стального трафарета (температура накаливания 240°C, экспозиция 5 сек) на предварительно эпилированный участок кожи спины под комбинированным наркозом. Через 3 часа после ожога всем животным под общей анестезией осуществляли некрэктомию ожогового струпа: при помощи скальпеля по границе ожоговой раны выполнили вертикальный окаймляющий разрез до внутрикожного мышечного слоя (*ranniculus carnosus*), резецировали участок кожи путём острой препаровки и отслоения дермы от внутрикожного слоя мышц [248].

Ведение ран осуществляли закрытым способом под стерильными гидрогелевыми повязками и повязками Cosmopor E (Hartmann, Германия), а также самофиксирующимися бинтами Peha-haft (Hartmann, Германия). Между раной и гидрогелевой повязкой размещали исследуемое покрытие.

Ежедневно проводили смачивание ран и повязок 4%-ным раствором гентамицина (Дальхимфарм, Россия). перевязки осуществлялись 1 раз в 3–4 суток под общей анестезией (рис. 8). Животные были выведены на 28 суток под наркозом, промежуточные исследования проводили на 7, 14, 21 сутки.



Рис. 8. Этапы нанесения ожоговой раны и наложения покрытия: а – наложение покрытия и гидрогелевой повязки; б – наложение повязки Cosmopor E; в – покрытие самофиксирующимися бинтами Reha-haft

Оценка динамики заживления ожогового дефекта осуществляли планиметрическим методом (рис. 9). Начиная со вторых суток после нанесения повреждения, ежедневно на прозрачную плёнку наносили контуры каждого дефекта, затем считали его площадь с помощью миллиметровой бумаги. Абсолютную площадь (S , cm^2) поверхностного дефекта кожи рассчитывали по формуле 12 [249]:

$$S = n + \frac{1}{2} k, \quad (12)$$

где n – количество квадратов размером 1×1 мм, полностью находящихся в пределах контура раны; k – количество квадратов размером 1×1 мм, частично находящихся в пределах контура раны.

Относительное уменьшение площади раны ΔS за сутки, характеризующее скорость заживления ожоговых дефектов, вычисляли по формуле 13:

$$\Delta S = (S_{\text{исх}} - S_1) / S_{\text{исх}} \times 100\%, \quad (13)$$

где $S_{\text{исх}}$ – исходная площадь ожога, S_1 – площадь раны на текущий день измерения.

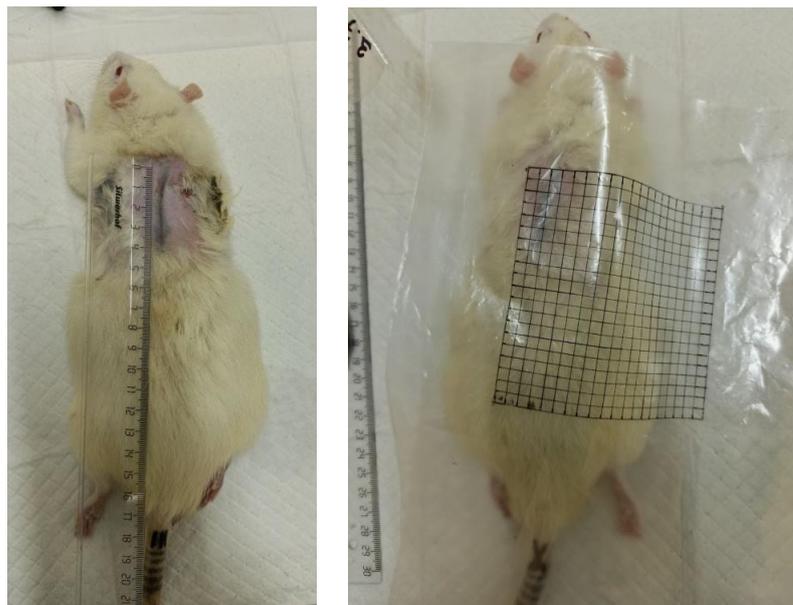


Рис. 9. Планиметрия ран

Морфологические исследования выполнены в ветеринарной лаборатории «ВЕТТЕСТ» (г. Н. Новгород, ул. 1-я Оранжевая, д. 30А, приложение 1 и 2).

У 10 интактных крыс, находившихся в условиях содержания, аналогичных животным, включенным в эксперимент, но без каких-либо вмешательств, оценивали показатели микроциркуляции (приложение 3). Уровень микроциркуляции в интактной коже и ожоговой ране оценивали методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) [250-252] с помощью лазерного анализатора «ЛАКК-М» (исполнение 2) (Лазма, Россия), ведя запись на протяжении 3 минут.

При исследовании уровня микрогемоциркуляции ткани рассчитывали показатель микроциркуляции (ПМ) по формуле 14:

$$\text{ПМ} = K \cdot N_{\text{эр}} \cdot V_{\text{ср}}, \quad (14)$$

где K – коэффициент пропорциональности ($K=1$);

$N_{\text{эр}}$ – количество эритроцитов;

$V_{\text{ср}}$ – средняя скорость эритроцитов в зондируемом объеме.

ПМ характеризует средний уровень перфузии (средний поток эритроцитов) в единице объема ткани за единицу времени. ПМ измеряется в перфузионных единицах. Данный показатель дает интегральную оценку состояния микроциркуляции исследуемого участка ткани.

Используя программу LDF 3, был проведен Вейвлет-анализ для расчета частотных колебаний кровотока с целью выявления роли активных (эндотелиальные колебания (Э) - 0,01–0,08 Гц., нейрогенные колебания (Н) – 0,08–0,2 Гц., миогенные колебания (М) - 0,2–0,7 Гц) и пассивных (дыхательные (Д) - 0,7–2 Гц., сердечные (С) - 2–5 Гц.) факторов регуляции микрокровоотока с последующим вычислением показателя шунтирования – ПШ.

Статистическая обработка полученных данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel, Statistica 6.0 (Statsoft Inc., USA). Результаты экспериментального исследования представляли в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$).

ГЛАВА 3. Результаты и их обсуждение

«Зеленая химия» является основополагающим руководством по снижению загрязнения и защите окружающей среды и направлена, в частности, на минимизацию образования отходов, использование селективных и эффективных каталитических преобразований путем использования природных факторов. Главная цель научных исследований в рамках «зеленой химии» — разработка эффективных и устойчивых процессов, способствуя более зеленому и более экологичному будущему.

В данной работе в качестве основы для получения новых полимерных материалов используется тресковый коллаген, выделенный из отходов переработки промысловой рыбы трески по оригинальной авторской методике [235, 236]. Кроме того, основным инструментом получения конечных продуктов является гетерогенный фотокатализ при облучении видимым излучением. Катализ является одним из ключевых направлений зеленой химии, поскольку, как правило, не требует больших температур, давлений, а значит, приводит к экономии энергии. Гетерогенный фотокатализ благодаря возможности использования катализатора повторно, а особенно, в случае активации в области видимого света, может означать ещё большие экономические и экологические преимущества. Гетерогенные методы фотокаталитического органического синтеза в основном находятся на стадии исследований и имеют ограниченное коммерческое применение. Однако дальнейшее развитие этого метода как жизнеспособной «более экологичной» альтернативы методам, использующим высокие температуры и давление, крайне перспективно.

Целью настоящей является синтез трехмерных структур для медицинских целей с использованием гетерогенного фотокатализа в присутствии сложных оксидов металлов под действием видимого света в водной дисперсии для радикального инициирования привитой сополимеризации метилметакрилата (ММА) на ТК при варьировании состава исходной реакционной смеси путем введения известных модифицирующих

добавок, а также исследование биоразрушения коллагена и сополимеров на его основе и испытание биосовместимости новых гидрогелей. Указанная специфика работы позволяет считать, что она имеет прямое отношение к «зеленой химии».

3.1. Теоретическое обоснование концепции получения трехмерных структур на основе природных и синтетических полимеров в присутствии сложных оксидов [253]

Облучение сложного оксида структурного типа β -пирохлора при контакте с водой приводит к образованию электроно-дырочных пар, которые могут приводить к ряду превращений по схемам 1-7 на рис. 6 [206-218, 254, 255].

В атмосфере инертного газа окислительные процессы с участием кислорода воздуха заметно ограничиваются, а схема окислительно-восстановительных процессов выглядит иначе (рис. 10).

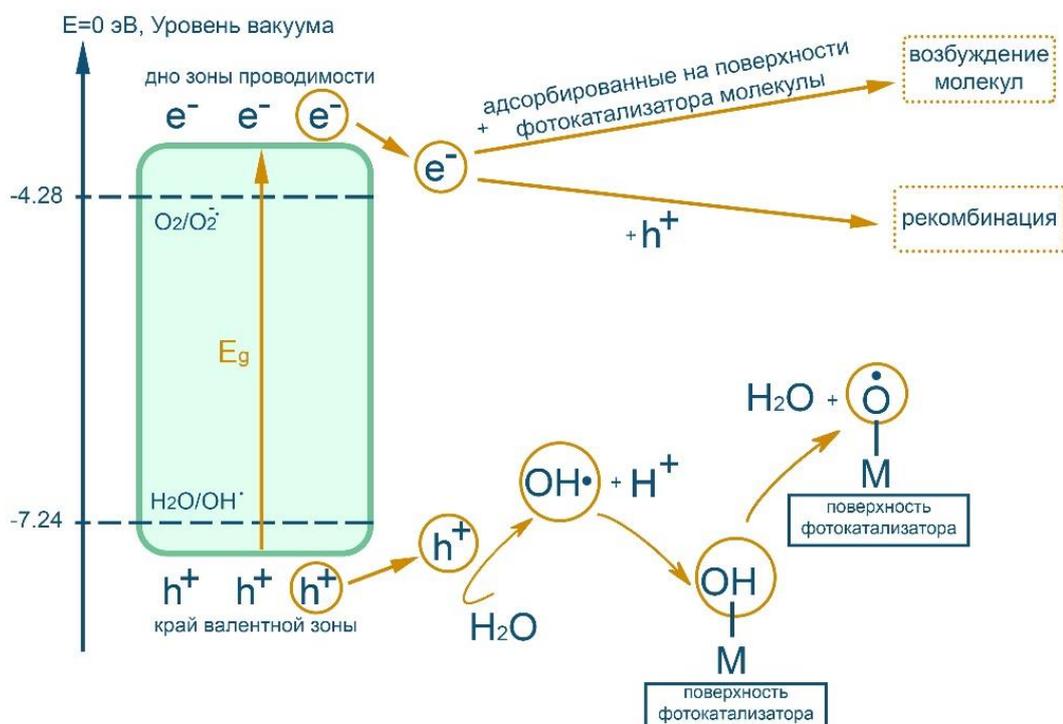


Рис. 10. Схема превращений при фотокатализе в водной дисперсии со сложными оксидами в атмосфере инертного газа

Радикальную природу имеют частицы HO_2^\cdot , O_2^\cdot и HO^\cdot , O^\cdot (см. рис. 10). В атмосфере инертного газа образование частиц HO_2^\cdot , O_2^\cdot и O^\cdot будет минимальным, хотя в любом случае склонность к радикальному взаимодействию с органическими субстратами имеет только гидроксильный радикал [256, 257]. Характерной реакцией его является отрыв атома водорода от органического субстрата с образованием воды и соответствующего радикала [257]. Если процесс проходит в воде в контакте с воздухом, то вполне возможно присоединение молекулы кислорода с образованием пероксидного радикала и последующее окисление органического субстрата. В случае осуществления процесса в атмосфере инертного газа радикал органического субстрата, значительно более стабильный, чем гидроксильный радикал, способен к радикальным превращениям: рекомбинации, присоединению к кратной связи и т.п. [258].

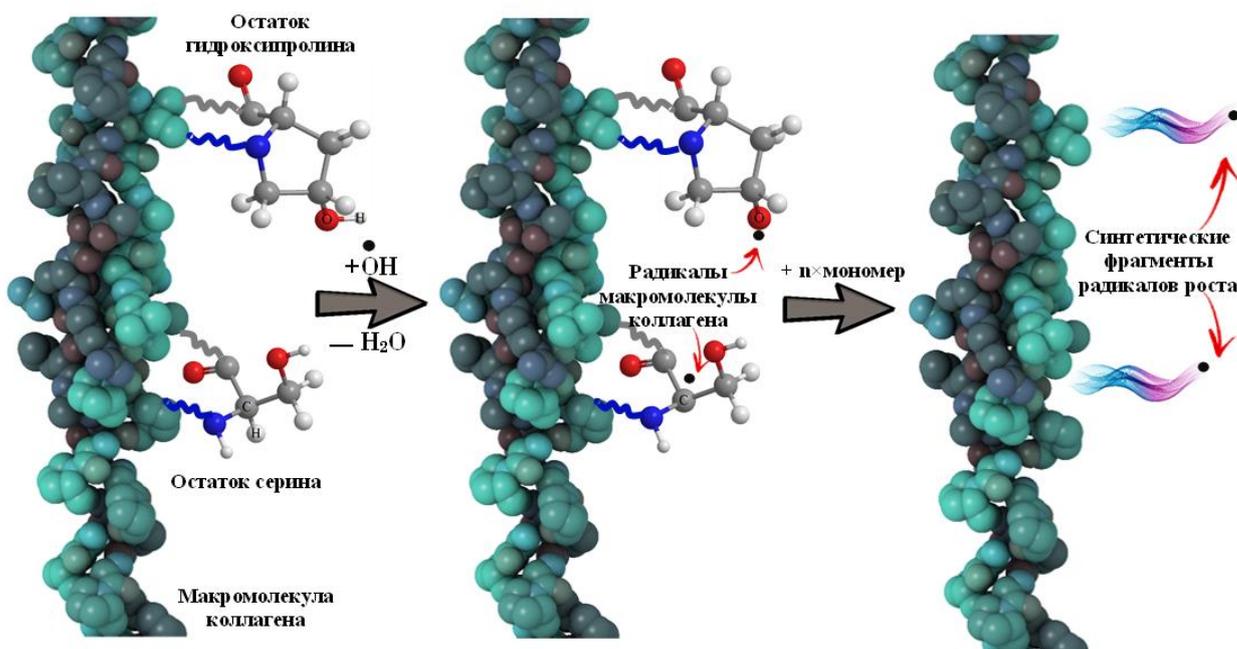
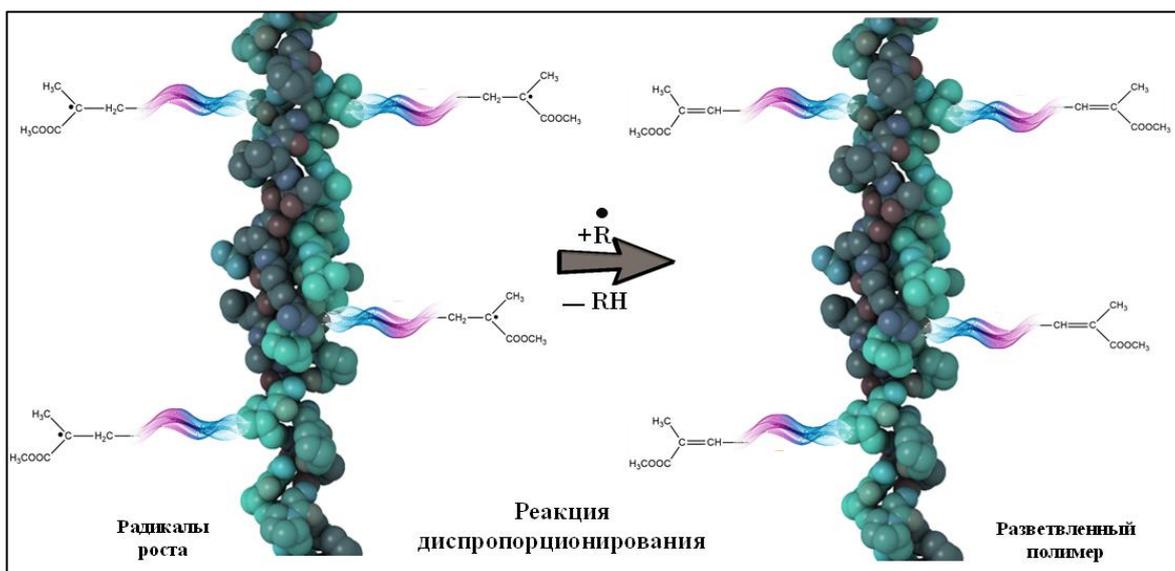


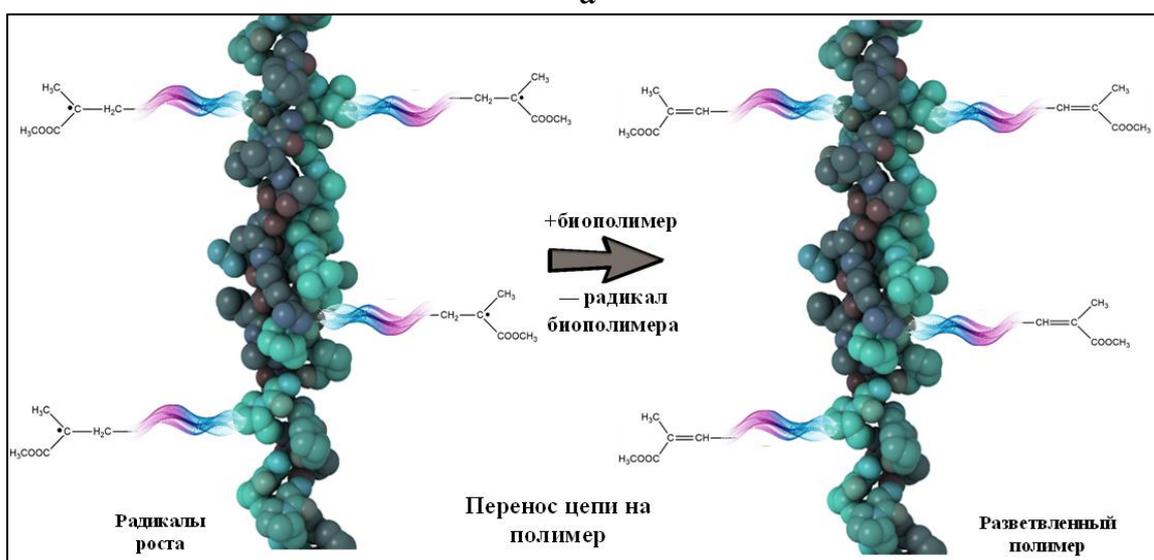
Рис. 11. Схема реакции взаимодействия гидроксильного радикала с макромолекулой коллагена

В плане поставленных задач обсуждаемых исследований именно на взаимодействие гидроксильного радикала, образующегося при фотокатализе, с макромолекулами природного полимера (рис. 11) с образованием макромолекулярных радикалов опирались наши изыскания. Известно, что

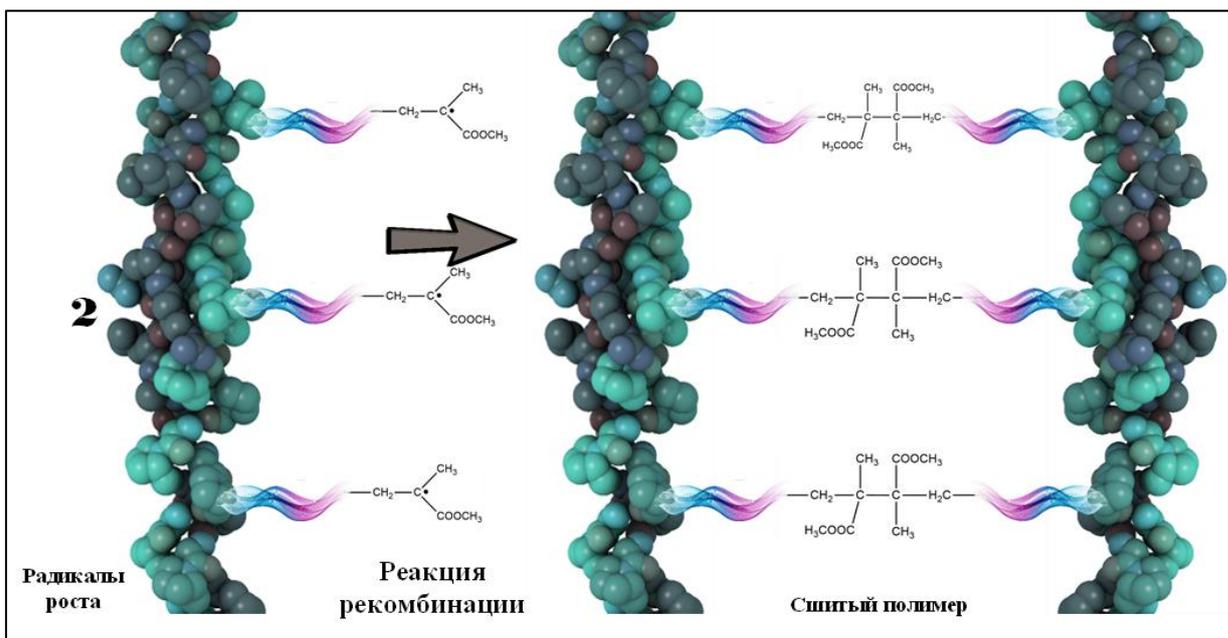
структурными элементами коллагена являются фрагменты с углеводородными участками, а также содержащие гидроксильную группу. В результате отрыва атома водорода от указанных фрагментов образуются макрорадикалы по схеме на рисунке 12. В дисперсии воды и винилового мономера в атмосфере инертного газа происходит присоединение полимерных синтетических фрагментов к макрорадикалам природного полимера, т.е. прививка синтетических фрагментов к макромолекуле природного полимера.



а



б



В

Рис. 12. Схемы реакции: а - диспропорционирования, б - передачи цепи, в - рекомбинации радикалов привитых сополимеров на основе коллагена

Очевидно, что в результате прививки будет образовываться разветвленный сополимер, если обрыв цепи происходит по реакции диспропорционирования (рис. 12, а) [258], или передачи цепи на полимер (рис. 12, б). Благодаря реакции обрыва полимерных цепей синтетических фрагментов путем рекомбинации, образуются поперечные сшивки между макромолекулами природного полимера (рис. 12, в) [258], т.е. трехмерные структуры – цель проводимых исследований.

Однако, сразу следует обратить внимание на несколько важных моментов получения пространственных макромолекулярных конструкций. Во-первых, в результате прививки ММА на коллаген в водной фазе наряду с трехмерными макромолекулами сшитой структуры или их ассоциатами будут сосуществовать фрагменты разветвленного привитого сополимера. Гидрогель на основе такой смеси будет структурно неустойчивым. При подготовке гидрогелей для медицины на стадиях испытаний, в частности, исследований биосовместимости, а также на первых этапах заживления раневых дефектов структурная устойчивость гидрогеля при определенных значениях рН, а именно рН плазмы крови – 7,2-7,4 [259, 260], и диапазоне

температур является необходимым условием. Кроме того, нужно иметь в виду, что пористая структура гидрогелей при использовании в медицине позволяет имитировать структуру нативной тканевой среды, облегчая обмен питательных веществ и формирование клеточных связей, критически важных процессов для регенерации тканей [261, 262]. Возможность миграции клеток и васкуляризации связаны с наличием размером взаимопроникающих пор от нескольких нм до десятков нм.

В связи с этим для формирования гелей медицинского профиля сополимер природного и синтетического фрагментов является лишь основой, практически всегда необходимо введение дополнительных компонентов с определенными характеристиками (сшивающих агентов, структурирующих добавок), это является наиболее распространённым методом [56, 57, 263-269]. Кроме перечисленных аспектов процесса привитой сополимеризации ММА на коллаген нельзя исключать возможность образования полиметилметакрилата (ПММА) в результате взаимодействия иницирующего радикала с молекулой мономера ММА по двойной связи и отрыва α -водорода от метильной группы ММА, а также других побочных взаимодействий в сложной системе фотокатализа в присутствии сложных оксидов.

Экспериментальные данные осуществления синтеза высокомолекулярных устойчивых гелей представлены в последующих разделах данной части диссертации.

3.1.1. Синтез привитых сополимеров метилметакрилата на тресковый коллаген в условиях гетерогенного фотокатализа в присутствии сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ [141, 270]

К началу экспериментальных исследований образования привитых сополимеров метилметакрилата на тресковый коллаген в условиях гетерогенного фотокатализа образование гидроксильного радикала было подтверждено в реакционной системе с использованием поглотителей

радикалов в случае оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ [271]. В качестве мономера использовали ММА, широко исследованный в радикальных процессах мономер. В случае ТК взаимодействие радикалов возможно с гидроксильной группой аминокислотного остатка или с атомом водорода углеводородной части молекулы аминокислотного остатка. Известно, что структурными элементами коллагена являются аминокислотные остатки с углеводородными фрагментами, а также содержащие гидроксильную группу (гидроксипролин (~15%), серин (~4%), гидроксизин (~1%)) [68]. В результате взаимодействия по схемам на рис. 11. и на примере фрагментов аминокислот гидроксипролина и серина на поверхности белка образуются радикалы, за счет которых происходит прививка ПММА на коллаген.

Анализ выделенного из водной фазы синтеза полимерного продукта свидетельствует об образовании привитого сополимера коллаген–ПММА: заметно выросла ММ исходного образца – с $M_n = 240$ до 270 кДа, при этом, коэффициент полидисперсности не изменил своего значения (табл. 3). Кроме того, содержание азота в сополимере коллаген–ПММА после синтеза заметно уменьшилось в сравнении с исходным образцом коллагена (см. табл. 3) и составляет ~70 %.

Таблица 3. Характеристики полимерных продуктов

№	Показатели характеристик	Образец полимера		
		Исходный коллаген	Привитой сополимер коллаген–ПММА	Привитой сополимер коллаген–ПММА после экстракции хлороформом
<i>По данным ГПХ</i>				
1	M_n , кДа	240	270	270
2	M_w , кДа	280	310	310
3	M_w/M_n	1,2	1,2	1,2
<i>По данным элементного анализа</i>				
4	Массовая доля азота, %	16,2	12,1	11,2
5	Содержание коллагена в образце, %	100	68	63

Фрагменты природного и синтетического полимеров были обнаружены методом ИК-спектроскопии при анализе пленок сополимера коллаген–ПММА (рис. 13, б). В ИК-спектре пленки коллагена видны характерные для белков полосы поглощения в области, каждая из которых соответствует колебаниям: 1600-1700 см^{-1} – NH- и C=O-связи; 1510-1570 см^{-1} – плоскостным деформационным колебаниям NH-связи; 1200-1350 см^{-1} – деформационным колебаниям C-N, NH-связей; 1720-1730 см^{-1} – валентным колебаниям карбоксильной группы C=O. В ИК-спектре ПММА характерной также является полоса поглощения в области 1720-1730 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям карбонильной группы C=O.

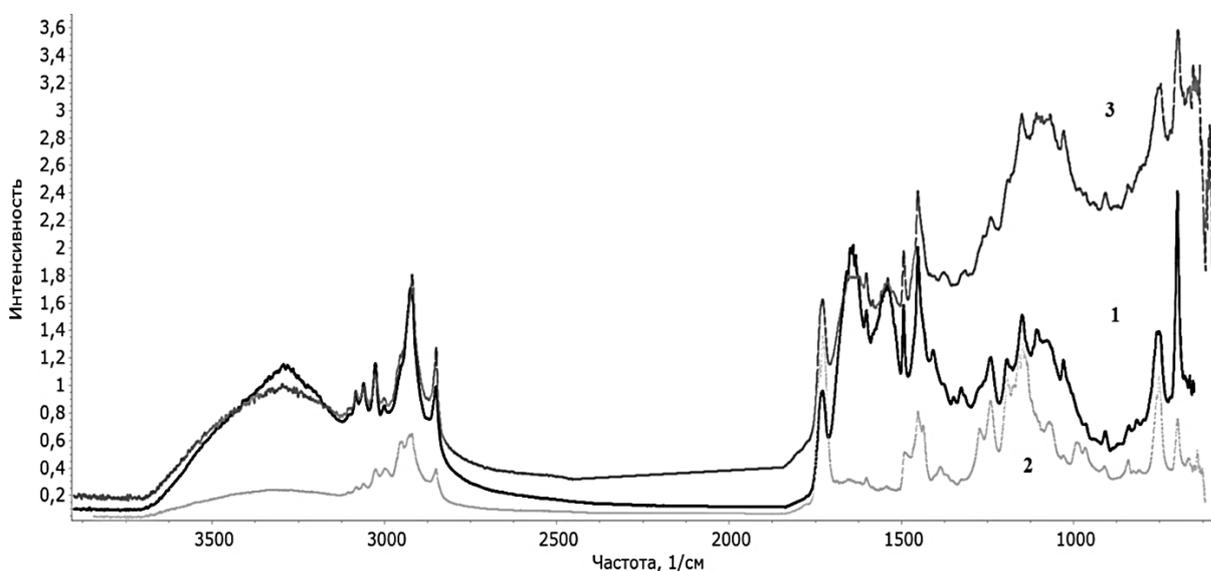


Рис. 13. ИК-спектры образцов: 1 – ТК, 2 – сополимер коллаген–ПММА, 3 – ПММА на ДАК

Сопоставление ИК-спектра сополимера коллаген–ПММА с ИК-спектрами коллагена и ПММА свидетельствует о том, что для сополимера наблюдаются все полосы, характерные для коллагена и ПММА.

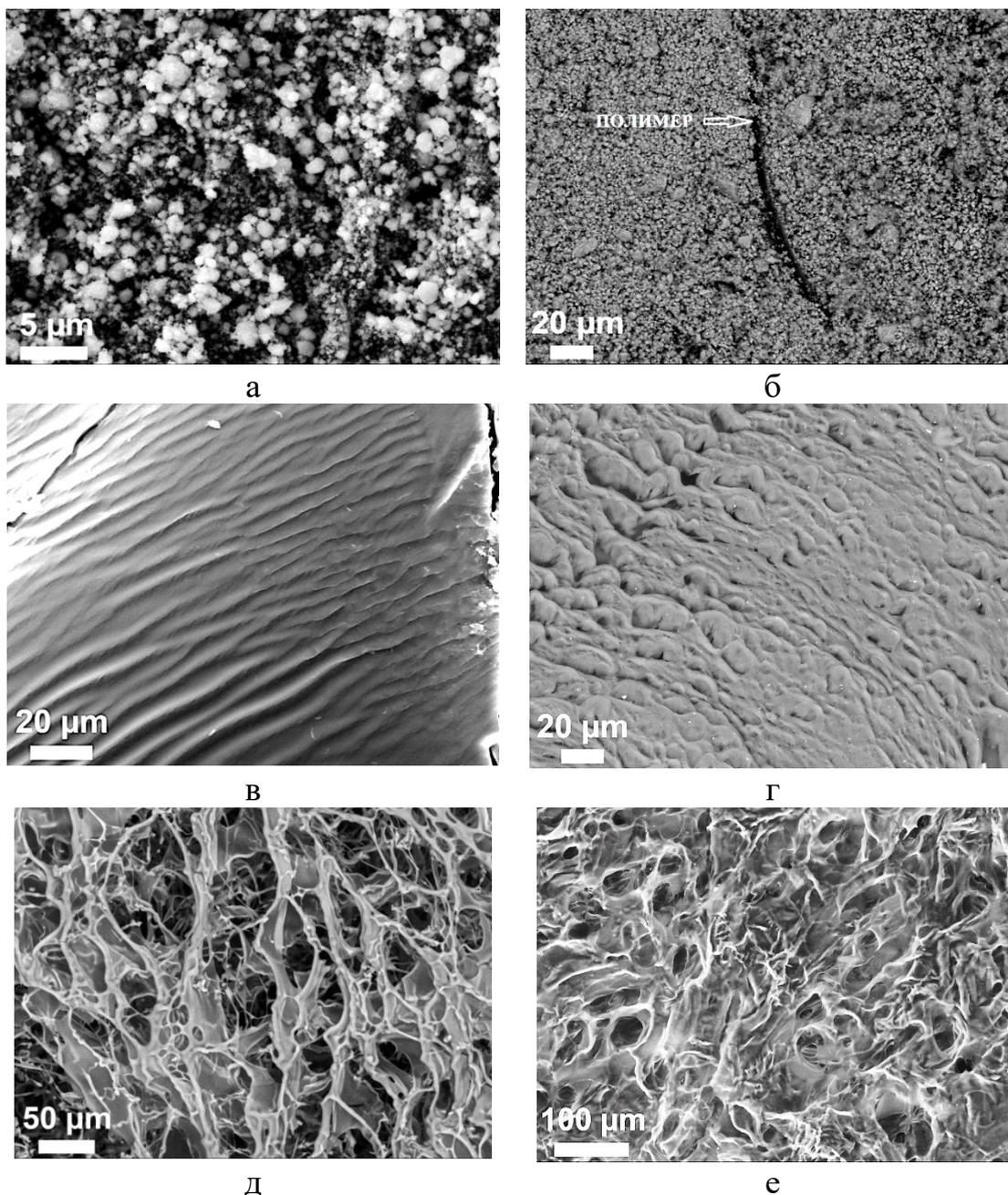


Рис. 14. Изображения СЭМ образцов оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ исходного (а), после сополимеризации (б) и образцов пленки коллагена (в), пленка сополимера коллаген–ПММА (г), губка коллагена (д), губка сополимера коллаген–ПММА (е)

Анализ СЭМ позволил установить морфологические различия исходного коллагена и сополимера коллаген–ПММА, свидетельствующие о включении фрагментов синтетического полимера в фибриллярную организацию коллагена. Так, если на пленке коллагена видна ярко выраженная волокнистая структура (см. рис. 14, в), то пленка привитого

сополимера коллаген–ПММА имеет более сложную поверхность (см. рис. 14, г). Губка коллагена имеет четкие очертания коллагеновых волокон и их переплетений (см. рис. 14д), в то время как на фотографии губки сополимера коллаген–ПММА четко видна более сложная структурно-рельефная организация между волокнами коллагена (см. рис. 14, е), образование пор за счет сшивки синтетическим полимером. Выявленные морфологические особенности сополимера коллаген–ПММА являются основанием для проведения исследований его как материала для скаффолда. Важное значение при этом имеет отсутствие в нем осколков инициатора органической природы, свойственное полимерам с вещественным иницированием.

3.1.2. Побочные реакции при фотокатализе в водной дисперсии с коллагеном в присутствии сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ [272]

При взаимодействии ТК и ММА при фотокатализе в водной дисперсии в присутствии сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ образование ПММА в синтезе не обнаружено ни в экстракте реакционной смеси толуолом, ни в экстракте сополимера коллаген–ПММА хлороформом в аппарате Сокслета.

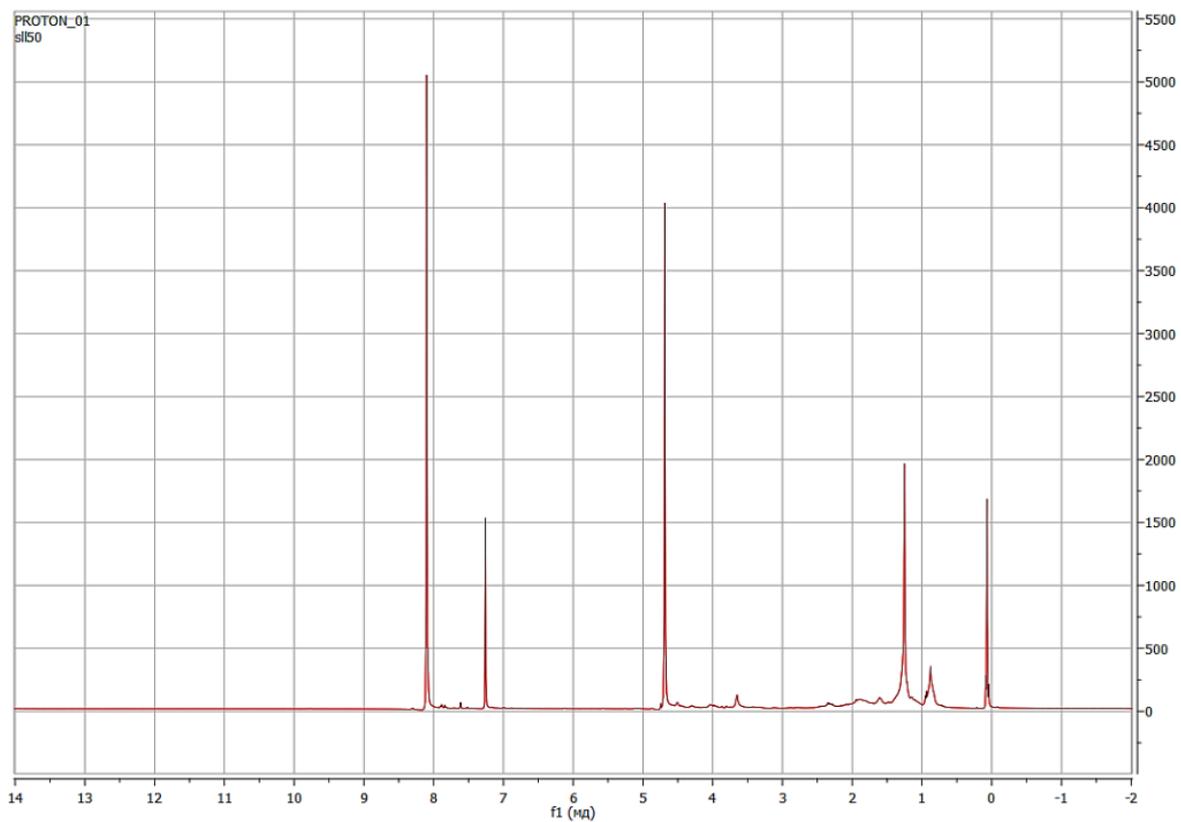
Хотя при полимеризации ММА в водной дисперсии с порошком катализатора после экстракции водной фазы хлороформом выделили полимер (5–10% в расчете на исходный ММА), который анализировали методом ГПХ в растворе ТГФ. Значения ММ и коэффициента полидисперсности представлены в таблице 4. Видно, что они имеют тот же порядок, что и при полимеризации ММА с использованием порошка оксида титана.

Таблица 4. Молекулярно-массовые параметры полимера при фотокатализе ММА на $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ и оксиде титана

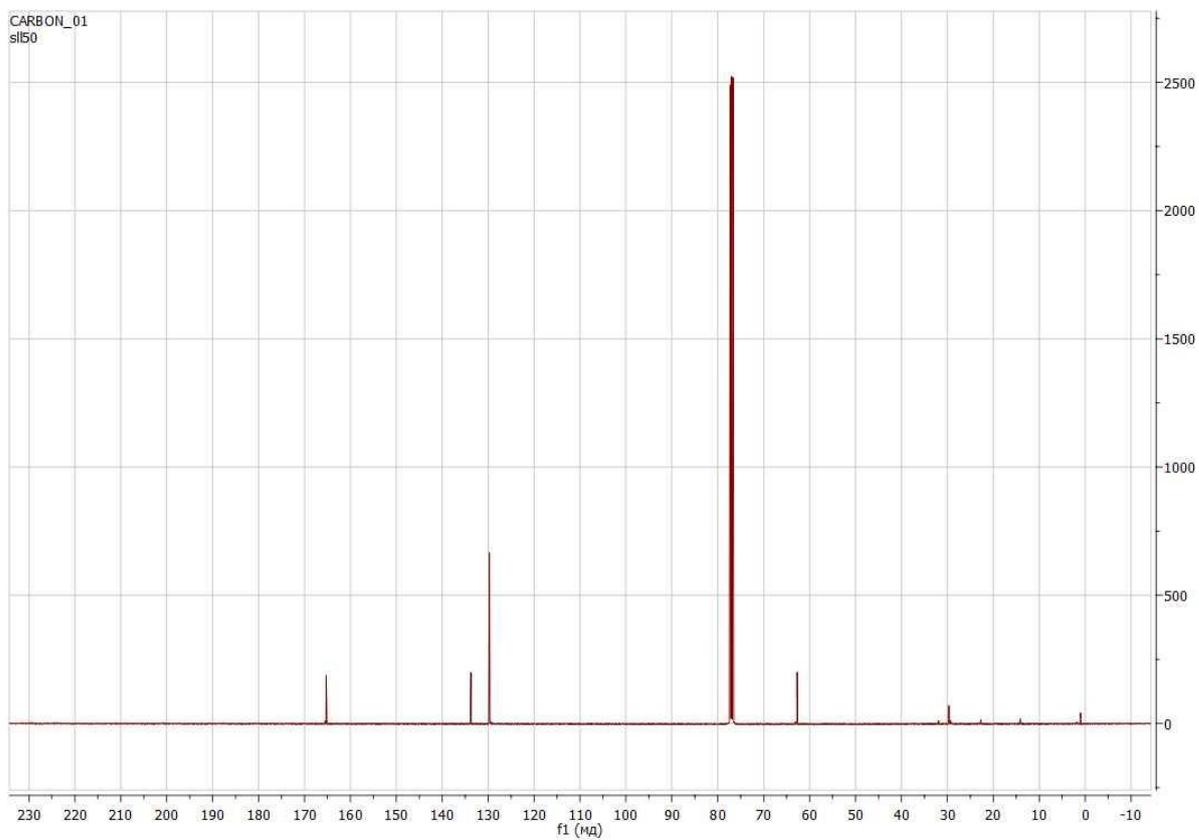
№ п/п	Условия выделения полимера	M_n , кДа	M_w , кДа	M_n/M_w	
1	Из органической фазы синтеза	140-145	310-315	2.2	
2*		а	381	610	1.6
б		181	253	1.4	
3	После экстракции оксида хлороформом	200-210	440-450	2.1	

*из публикации [216]: а – порошок оксида титана; б – оксид титана на стекловолокне.

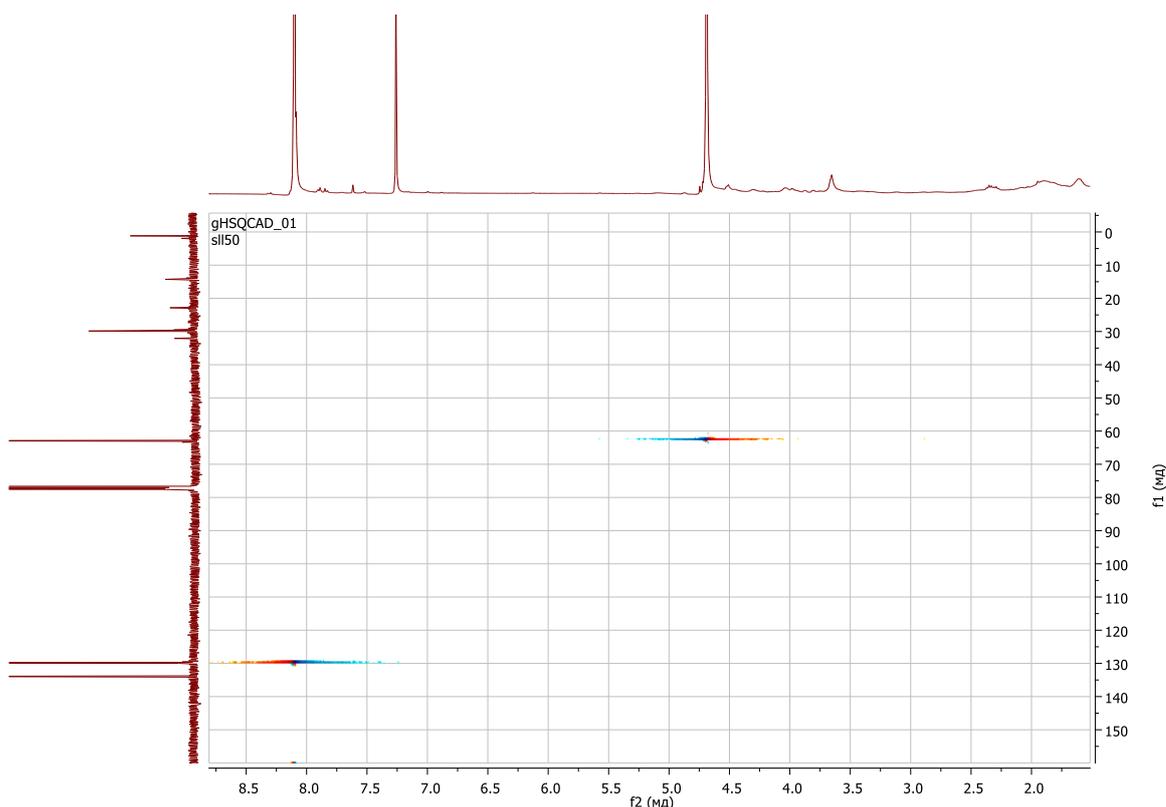
После экстракции порошка катализатора в приборе Сокслета выделен твердый полимер. Его исследовали методами ГПХ, ЯМР- и ИК-спектроскопии. Методом ГПХ были обнаружены высокомолекулярные продукты (табл. 4, строка 3) с сопоставимыми, но несколько большими значениями ММ полимера в сравнении с полимером, выделенным из органической фазы. По данным ЯМР-спектроскопии для полимера в спектре ЯМР ^1H (рис. 15, а) наблюдали два основных сигнала: синглеты при 4.69 и 8.10 м.д. с соотношением интенсивностей 1:1. Эти сигналы можно отнести к группам $-\text{OCH}_2\text{OC}(\text{O})-$ и геминальным протонам при двойной связи $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$, соответственно. Кроме того, в области 0.95-2.50 м.д. и 3.65 м.д. обнаружены слабые сигналы, которые относятся к ПММА. Содержание ПММА по этим данным не превышает 10% от содержания основного продукта. В спектре ЯМР ^{13}C (рис. 15, б) основному веществу принадлежат 4 сигнала: 62.7 м.д. - $\text{OCH}_2\text{O}-$; 129.7 м.д. $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$; 133.8 м.д. $\text{C}=\text{CH}_2$ и 165.3 м.д. $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$. Двумерный спектр С-Н-корреляции (рис. 15, в) подтверждает, что атомы углерода с химическими сдвигами 62.7 и 129.7 м.д. непосредственно соединены с атомами водорода.



a



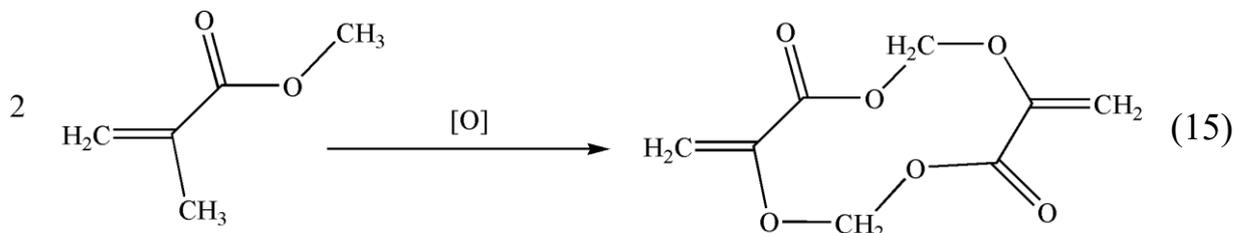
b



В

Рис. 15. Данные ЯМР-спектроскопии полимера, смытого с порошка $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ хлороформом после синтеза: ЯМР ^1H (а), ЯМР ^{13}C (б), С-Н-корреляция (в)

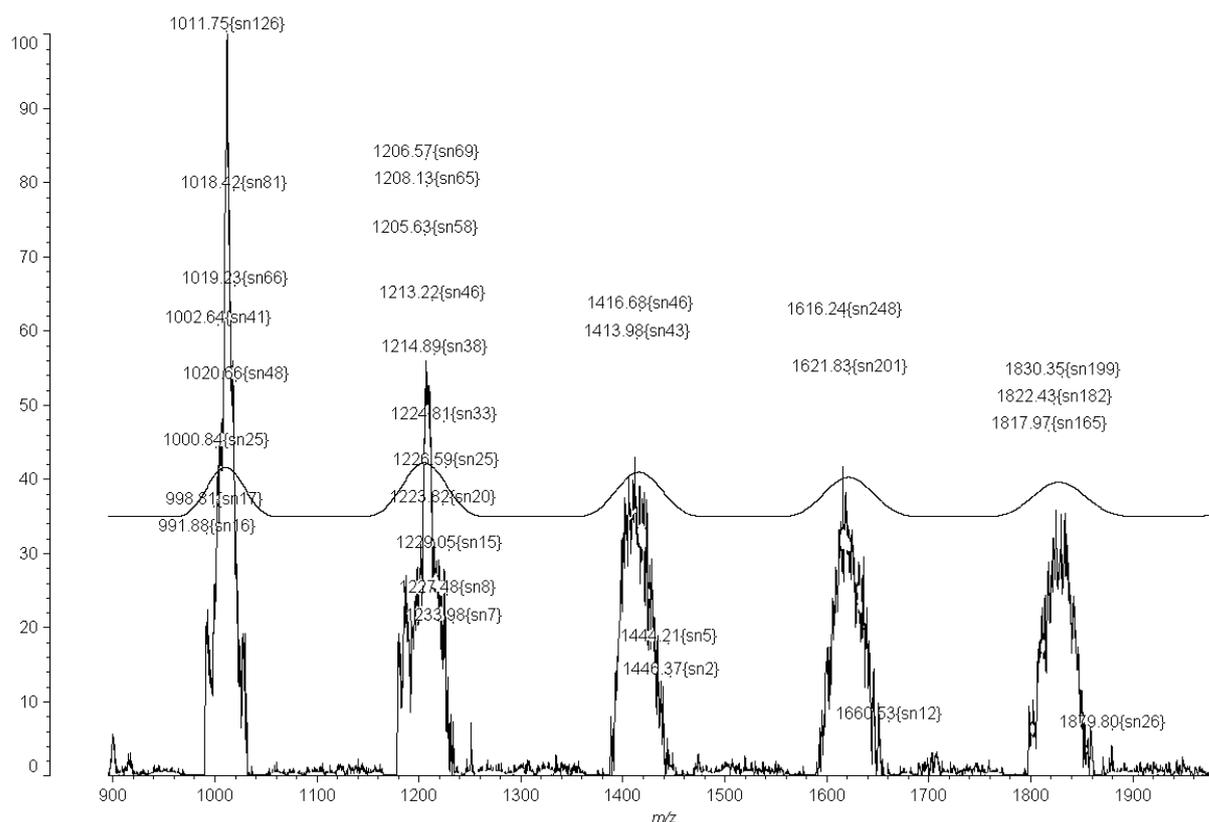
Методом МАЛДИ в экстракте хлороформа реакционной смеси ТК с ММА, так же, как и в экстракте органической фазы синтеза толуолом (рис. 16) обнаружены органические производные, отличающиеся от ММА. Разница ММ наблюдаемых продуктов реакции кратна ~ 200 и соответствует продукту окислительной димеризации ММА (ОММА) на поверхности оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ (схема 15):



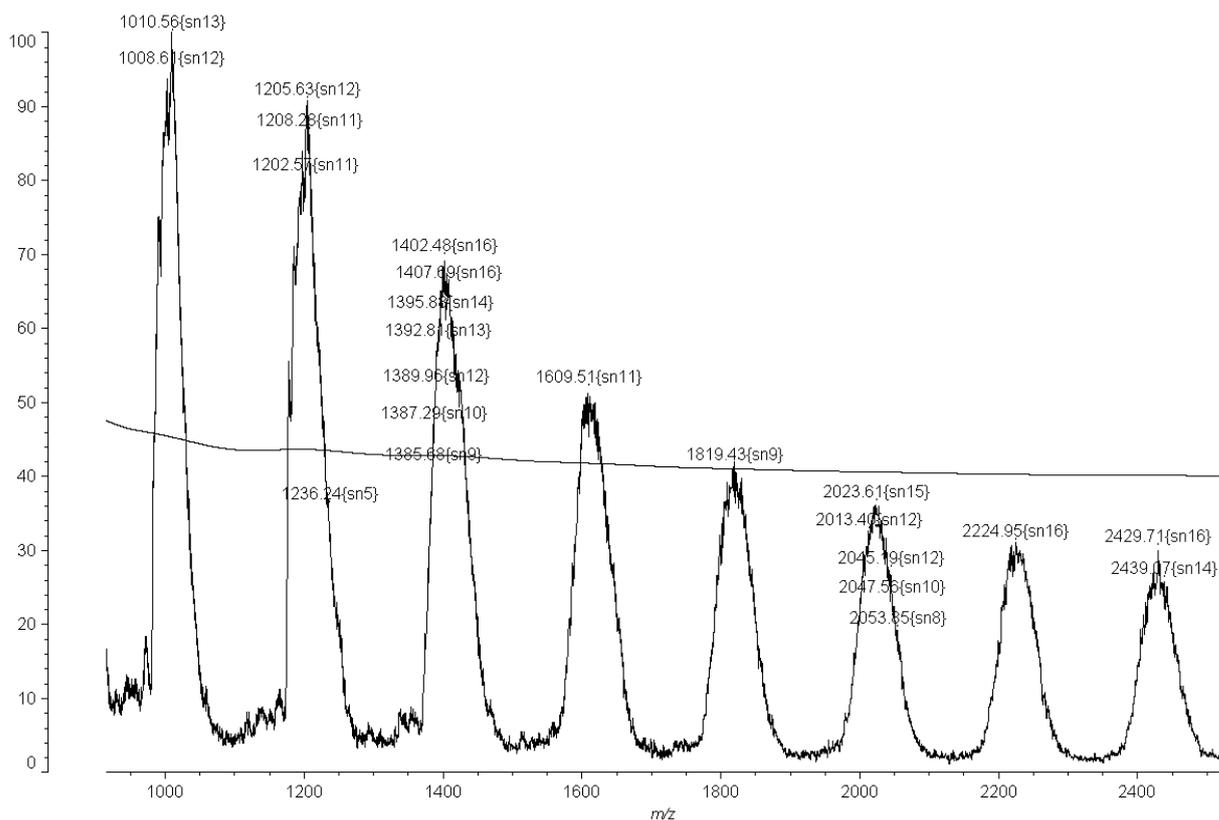
Кроме того, методом ПГХ в экстракте хлороформом не обнаружен ММА (продукт термодеструкции ПММА [273]), но присутствуют соединения с ММ больше 100. Перечисленные данные анализа органической

фазы синтеза и экстрактов продукта прививки свидетельствуют об образовании в процессе синтеза продуктов превращения ММА не по обычной схеме его радикальной полимеризации, а по схеме 15, часть которых адсорбируется на привитом сополимере коллаген–ПММА. Эти данные свидетельствуют об отличии процесса образования полимерных продуктов, протекающего при облучении видимым светом ($\lambda = 400-700$ нм) сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, от синтезов в присутствии традиционных радикальных инициаторов и трибутилбора с окислителем, когда в органической фазе всегда образуется ПММА [168-170].

Интересно, что при изучении поверхности порошка $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ после синтеза сополимера коллаген–ПММА методом СЭМ и РМА, были обнаружены фрагменты полимерных макромолекул (рис. 14, б), которые отсутствуют на исходном катализаторе (рис. 14, а).



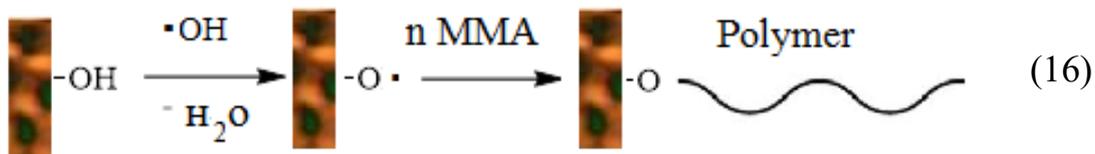
а



б

Рис. 16. Масс-спектр МАЛДИ продуктов экстракта хлороформом привитого сополимера коллаген–ПММА (а) и продуктов органической фазы синтеза сополимера коллаген–ПММА в толуоле (б). Катионирующий агент – натрий

Прививка ПММА на поверхность оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$, вероятнее всего, проходит по схеме 16. Данные об активной роли соединений переходных металлов в полимеризационных процессах хорошо известны [274, 275].



Полимер с поверхности оксида не смывается ни ТГФ, ни хлороформом в аппарате Сокслета. Удалить полимер с поверхности удалось при обработке водной эмульсии ультразвуком в течение 40 мин. Это свидетельствует об образовании на поверхности порошка ковалентно связанного полимера,

который, закрывая поверхность, может препятствовать выходу радикалов в объем реакционной смеси. Более подробно особенности изменений поверхности фотокатализатора и продуктов окисления ММА на его поверхности при облучении видимым светом $\lambda = 400-700$ нм при температуре 20-25⁰С, а также условия регенерации для его повторного использования представлены в разделах 3.1.4. и 3.1.5.

3.1.3. Модификация сополимера коллаген–ПММА для получения гидрогеля [253, 276, 277]

Результаты исследований, представленные в разделе 3.1.1. показывают, что привитые сополимеры коллаген–ПММА можно рассматривать только как прекурсоры устойчивых трехмерных структур. Создание таковых требует разработки композитных материалов на его основе путем введения дополнительных компонентов с определенными характеристиками [278-296].

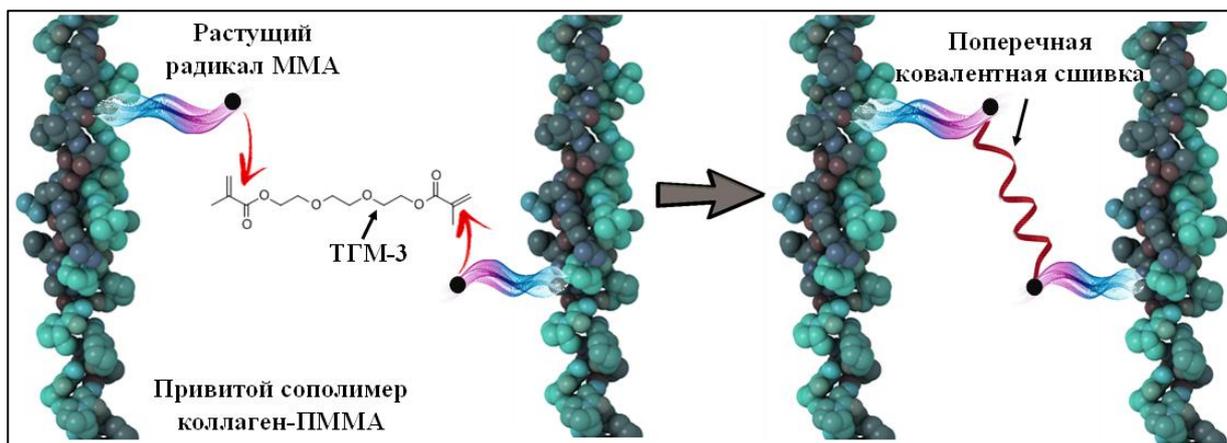
Самым известным и широко распространенным модификатором свойств белковых субстратов в медицинской и фармацевтической практике является ПЭГ [278-281]. Обществом по питанию и лекарственным препаратам США (FDA) в качестве субстанции ПЭГ разрешен к использованию в медицине (производство лекарственных препаратов), продуктах питания и косметологии [278], в качестве пищевой добавки E1521 в странах ЕС и в РФ [297]. Модификация с использованием ПЭГ (пегилирование) приводит к изменениям свойств пептидного субстрата. Так, например, установлено [283], что ковалентные связи ПЭГ с фрагментами аминокислот лизина и аргинина (карбоксильные группы) препятствуют расщеплению модифицированных молекул при протеолизе; ковалентное соединение с белком происходит с атомом азота аминогруппы лизина или имидазольной группы гистидина. Такие связи позволяют активировать гидроксильные группы ПЭГ. Кроме того, одним из ресурсов модифицированных с помощью ПЭГ материалов является потенциальная возможность формирования водородных связей за счет атомов водорода

основной цепи ПЭГ, из-за чего значительно повышается его гидродинамический радиус. Наряду с этим, ПЭГ как хороший пластификатор может влиять на эластичность, трещинообразование, механические характеристики и адгезию пленочных покрытий.

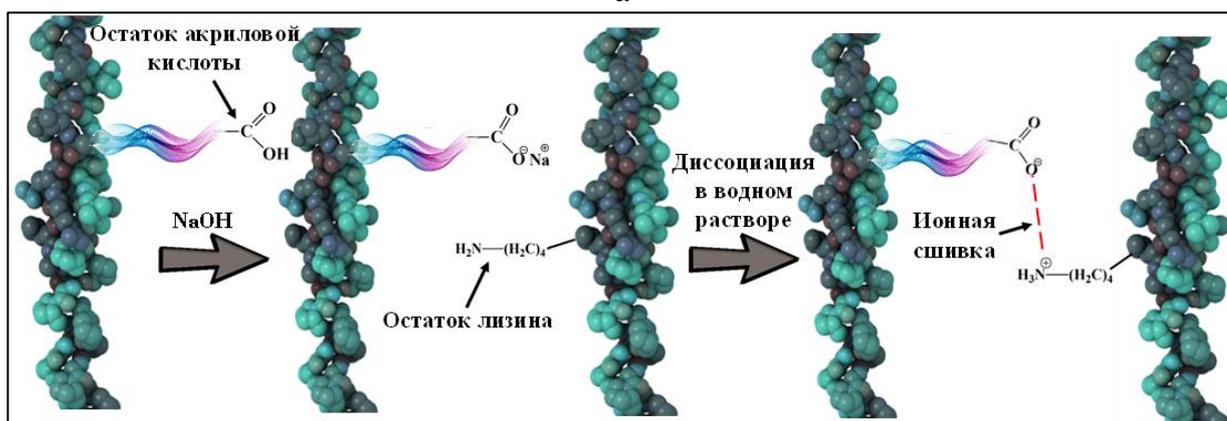
Проведенные исследования ученых в области изменения свойств материалов на основе природных полимеров путем добавления химических агентов и модификаторов свидетельствуют о перспективности данного направления. На этапе получения устойчивых гидрогелей поставлена цель – проследить изменение свойств привитых сополимеров ММА на коллаген, синтезированных с использованием фотокатализа в присутствии сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$, при модификации состава исходной реакционной смеси, а также на стадии выделения путем введения известных модифицирующих добавок. Для этого были использованы следующие известные подходы:

- Введение в состав исходной реакционной смеси модификатор свойств белковых субстратов - ПЭГ и контроль его влияния на состав и свойства полученного композита в сравнении с сополимером коллаген–ПММА;
- Дополнение состава исходной реакционной смеси сшивающим агентом для акрилатных составов - ТГМ-3 и акриловой кислотой для образования дополнительной к известной естественной для белков ионной «сшивки» в композите после нейтрализации конечного продукта и оценка их влияния на состав и свойства полученного композита в сравнении с сополимером коллаген–ПММА;
- Дополнение исходного состава реагентов известным сшивающим агентом для белков – ГА с целью получения мелких пор размером нескольких нм.

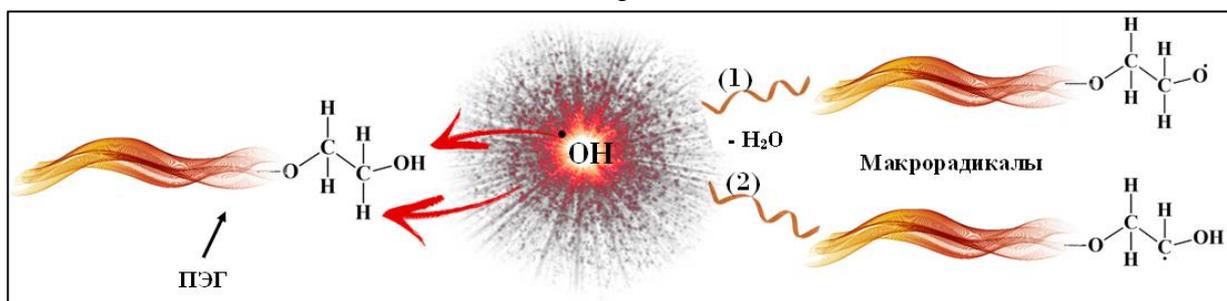
Образование поперечных сшивок в соответствии с природой введенных добавок представлено на рис. 17.



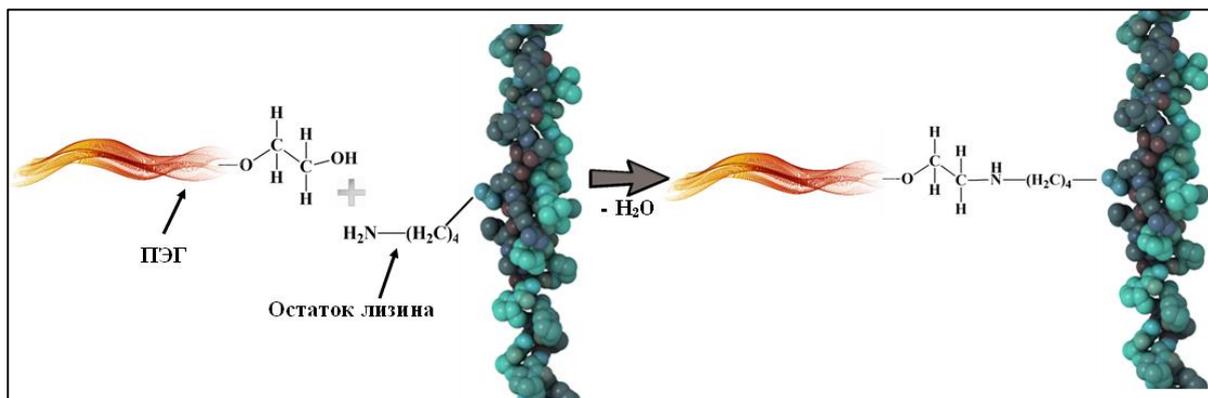
а



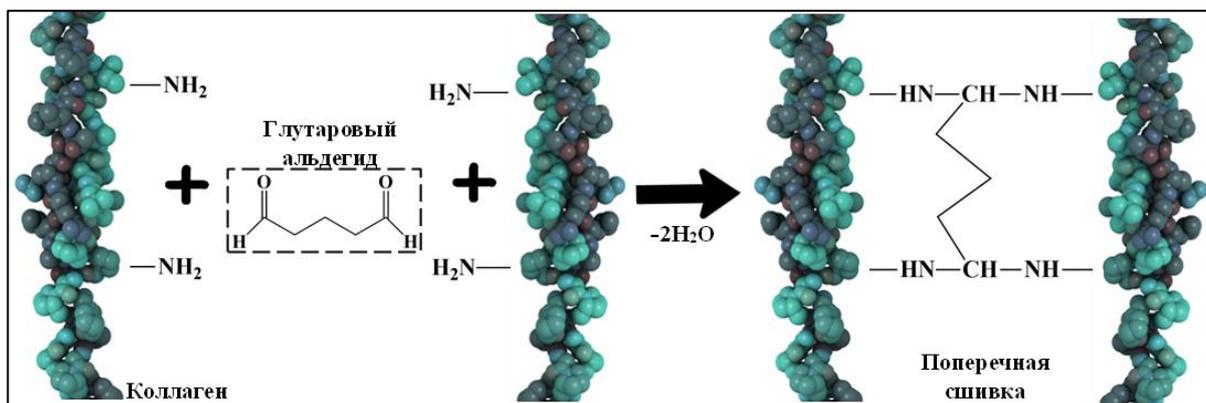
б



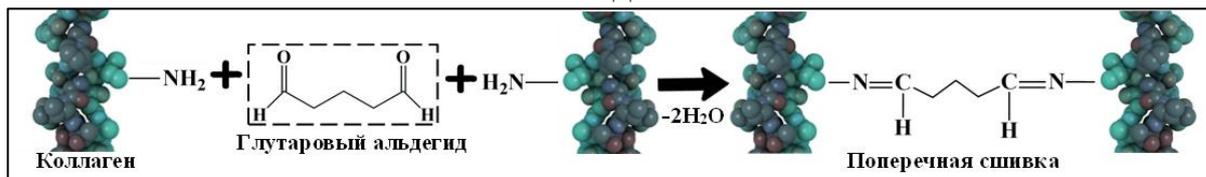
в



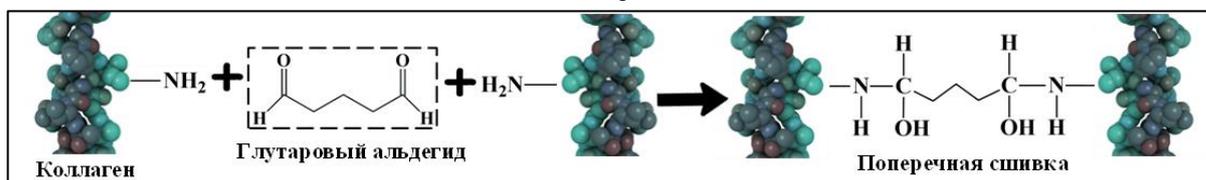
г



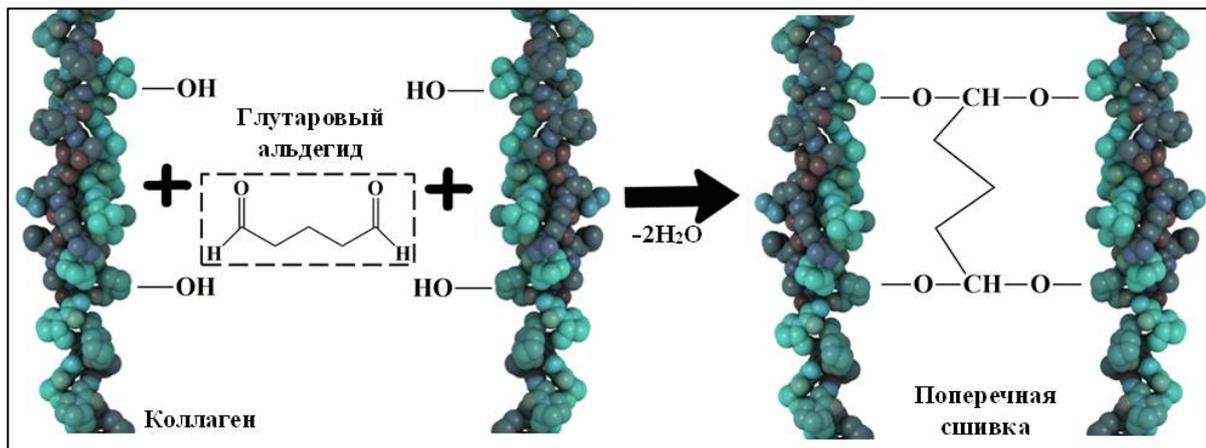
Д



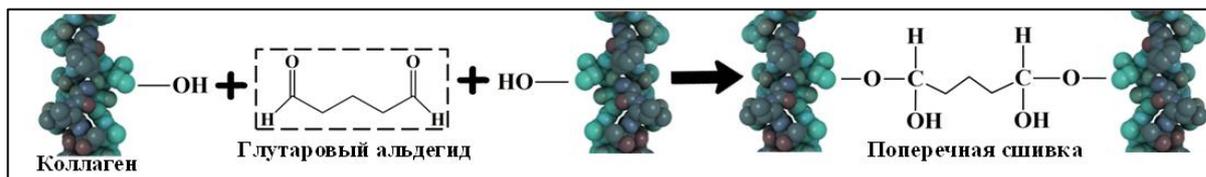
е



ж



з



и

Рис. 17. Схема ковалентной сшивки молекул коллагена с участием ТГМ-3 (а), акриловой кислоты (б), ПЭГ за счет радикального взаимодействия (в) и с фрагментами аминокислоты на примере лизина (г), с ГА (д-и)

Процесс синтеза сополимера в дисперсии из смеси состава ТК:ММА:ТГМ-3:АК:вода (ТКС-1) в присутствии фотокатализатора оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ проводили аналогично описанному в разделе 3.1.2., дополнив его ТГМ-3 и АК. После синтеза разделяли органическую и водную фазы. Водная фаза, как и в случае привитого сополимера коллаген–ПММА, представляет собой устойчивый однородный раствор полимерного продукта белого цвета (рис. 18, а).

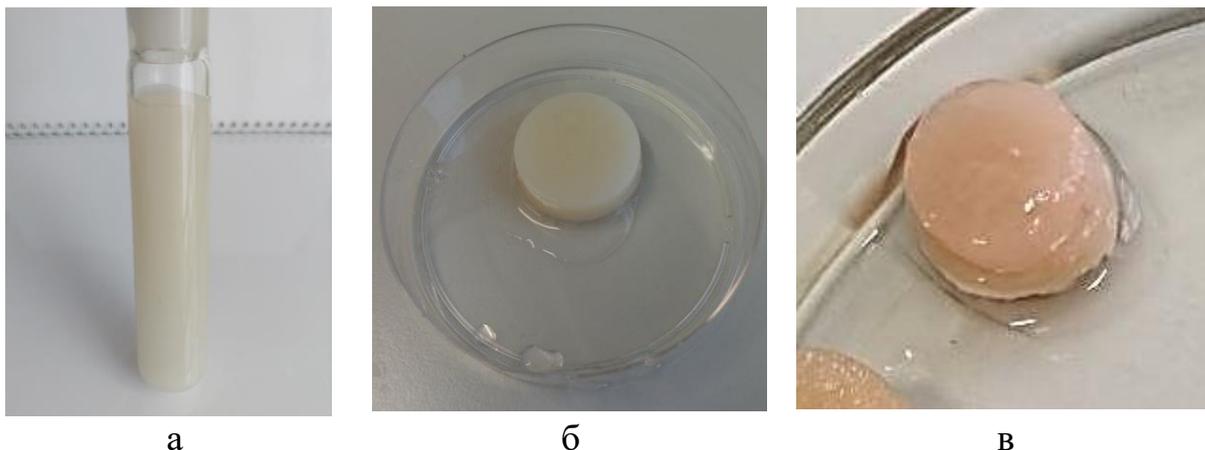


Рис. 18. Фотографии раствора ТКС-1 (а), геля ТКС-3 (б), ТКС-Г (в)

Исследование прежде всего содержания азота в выделенном и нейтрализованном из водной фазы синтеза полимерного продукта свидетельствует об образовании сополимера ТКС-1 (рис. 19): это значение близко к таковому, как и содержание коллагена, для сополимера без сшивающих добавок.

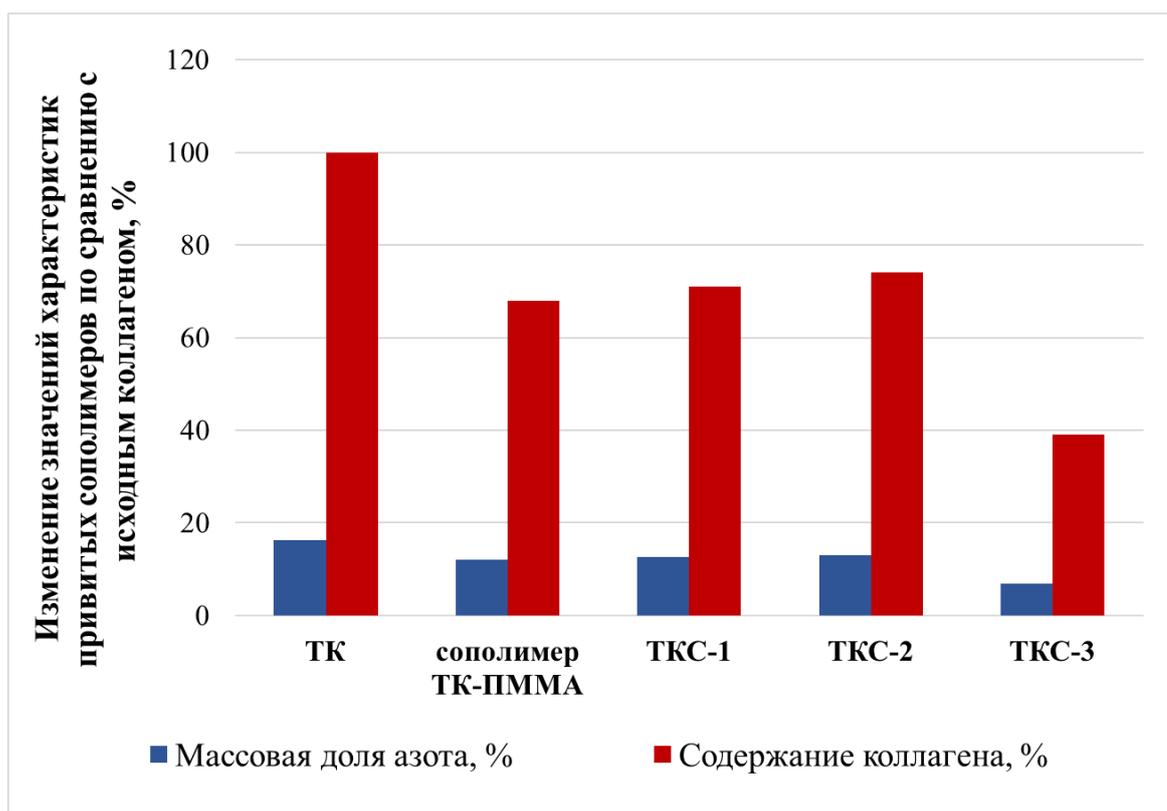


Рис. 19. Содержание азота и коллагена в образцах по данным элементного анализа

Самая интересная информация о ТКС-1 видна из сравнения изображений СЭМ (рис. 20, в, г) с таковыми для ТК (рис. 20, а), с сополимером коллаген–ПММА (рис. 20, б): видно, что за счет дополнительной сшивки при нейтрализации раствора полимера и с помощью ТГМ-3 образовалась матрица с размерами пор значительно большего диапазона. Если в случае привитого сополимера коллаген–ПММА это поры преимущественно с размерами ~ 50 нм, то в случае ТКС-1 этот диапазон значительно шире: от нескольких нанометров до ~ 50 нм. Хорошо видно, что коллагеновые волокна уплотнены привитым синтетическим фрагментом. Кроме того, важной особенностью матрицы является хорошо заметное взаимопроникновение пор.

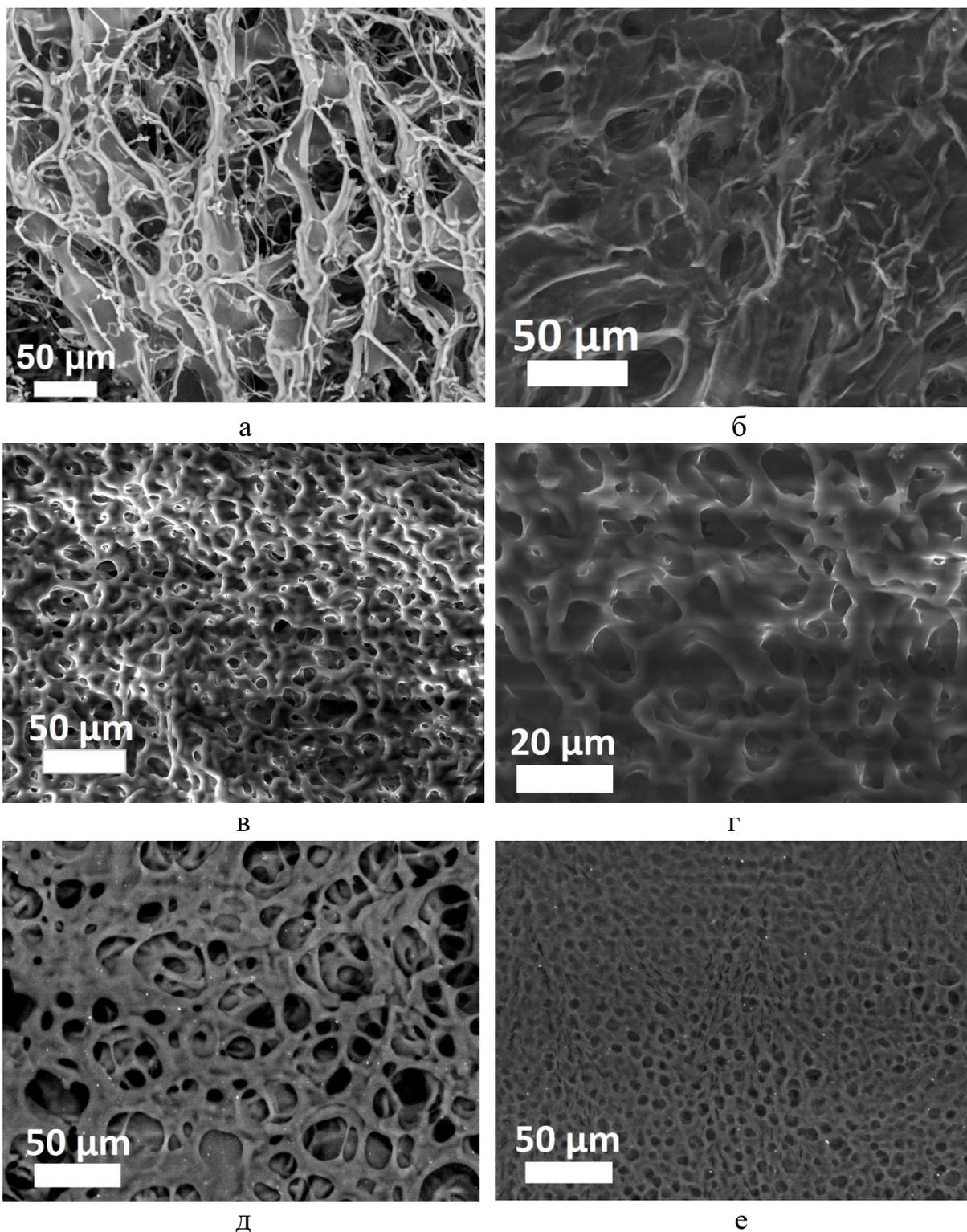


Рис. 20. Изображения СЭМ лиофильно высушенных губок ТК (а), привитых сополимеров коллаген–ПММА (б), ТКС-1 (в, г), ТКС-2 (д), ТКС-3 (е)

Тем не менее сополимер ТКС-1 в воде представляет собой гомогенную фазу, как представлено на рис. 18, а, коагуляции при нейтрализации кислого раствора щелочью не происходит. Но при этом оценить молекулярно-массовые параметры образовавшегося сополимера ТКС-1 не удалось: он

остался на фильтре с размерами пор 0,45 мкм при подготовке раствора полимера к анализу ГПХ.

В следующей серии экспериментов увеличили содержание ТК в смеси в два раза (ТКС-2). В этом случае органическая фаза после окончания синтеза отсутствовала. Это исключительно важно, т.к. процесс не требует стадии отделения органической фазы в синтезе. Водная фаза, как и в первом случае, представляет собой устойчивый однородный раствор полимерного продукта белого цвета. Увеличение ТК в реакционной смеси привело к незначительному увеличению содержания азота в полимере в сравнении с первым синтезом и соответствующему уменьшению содержания синтетического фрагмента в полимере. Сравнение изображений СЭМ образцов ТКС-2 (рис. 20, д) с ранее описанным образцом (рис. 20, в, г) показывает, что в этом случае морфология матриц очень похожа. Можно отметить больший разброс размеров ячеек, чем в образцах ТКС-1. Оценить молекулярно-массовые параметры образовавшегося сополимера ТКС-2 не удалось: он остался на фильтре с размерами пор 0,45 мкм при подготовке раствора полимера к анализу ГПХ.

В случае дополнения состава исходной реакционной смеси модификатором ПЭГ в количестве, сопоставимом с концентрацией ТК (ТКС-3), органическая фаза после окончания синтеза отсутствовала так же, как и в случае ТКС-2. Водная фаза до добавления раствора гидроксида натрия, как и в приведенных ранее примерах, представляет собой устойчивый однородный раствор полимерного продукта белого цвета без расслоения. Однако после добавления раствора щелочи до pH~7 наблюдается коагуляция полимерного продукта с образованием геля (рис. 18, б). Полученный гель легко отдает воду при сушке в вакууме и образует пленку полимерного композита.

Объяснить гелеобразование при введении в состав ПЭГ можно дополнительными радикальными процессами с его участием. Во-первых, за счет его взаимодействия в процессе синтеза так же, как и в случае коллагена, с гидроксильным радикалом за счет отрыва атома водорода от

гидроксильной группы ПЭГ по схеме 1 (рис. 17, в) или от атома водорода углеводородной части молекулы ПЭГ по схеме 2 (рис. 17, в), образуя радикалы в макромолекуле ПЭГ. Эти вновь образовавшиеся на поверхности ПЭГ радикалы активны во всех радикальных превращениях в реакционной смеси: взаимодействуют с мономером и образуют привитой синтетический фрагмент, или участвуют в реакции передачи цепи, или диспропорционируют с другим активным радикалом, т.е. образуют дополнительные ковалентные связи в материале. Во-вторых, как уже отмечалось ранее [283], ПЭГ образует ковалентные связи с фрагментами аминокислот лизина и аргинина (рис. 17, г на примере лизина). Во всех случаях ПЭГ выступает в качестве нейтрального гидрофильного компонента для обеспечения стерической стабилизации полимерного композита [278-283]. Совокупность всех химических взаимодействий в процессе получения нового материала и при нейтрализации реакционной смеси приводит к коагуляции гидрогеля.

Образовавшийся гидрогель отделяли от реакционной смеси и анализировали. Оказалось, что введение в реакционную смесь ПЭГ привело к заметному уменьшению содержания азота и, соответственно, коллагена в гидрогеле в сравнении с ранее приведенными образцами. Сравнение изображений СЭМ образцов ТКС-3 (рис. 20, е) с ранее описанными образцами ТКС-1 и ТКС-2 (рис. 20, в-д) показывает, что благодаря сшивке за счет химических реакций в реакционной смеси при нейтрализации раствора полимера так же, как и в случае образцов ТКС-1 и ТКС-2, наблюдается в основном матрица с мелкой ячеистой структурой, но имеют место и поры большего размера. Аналогично в предыдущих случаях со сшивающими агентами в синтезе оценить молекулярно-массовые параметры образовавшегося сополимера ТКС-3 не удалось: он остался на фильтре с размерами пор 0,45 мкм при подготовке раствора полимера к анализу ГПХ. В отфильтрованной водной фазе остался не встроившийся в матрицу сополимер коллаген–ПММА и ПЭГ (в соотношении привитой сополимер : ПЭГ ~ 1:1).

Гидрогель ТКС-3 при выдерживании при комнатной температуре теряет свою форму. Введение в состав исходной смеси незначительных количеств глутарового альдегида, являющегося эффективным сшивающим агентом для белков [298-300], приводит к образованию структурно устойчивого гидрогеля (ТКС-Г). Такой гидрогель сохраняет форму при длительном хранении и восстанавливает форму после удаления воды при размещении в водном растворе. ГА вступает в реакцию с белками, такими как коллаген. Механизм сшивки ГА молекул коллагена (кросс-линк) представлен на рис. 17, д-и. Образцы ТКС-Г так же имели внешние отличия от ТКС-3 (рис. 18, в).

Таким образом, показана возможность получения устойчивых гидрогелей на основе сополимеров трескового коллагена и акрилатов, синтезированных в условиях фотокатализа видимым светом в присутствии сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ путем введения модифицирующих и сшивающих добавок, которые можно рассматривать в качестве перспективных материалов для регенеративной медицины. Предварительные испытания новых гидрогелей для проведения доклинических исследований цитотоксичности и биосовместимости *in vitro* и результаты МТТ-теста образцов представлены в разделе 3.4.

3.1.4. Влияние природы сложного оксида металлов на продукты фотокатализа реакций метилметакрилата и трескового коллагена в водной дисперсии [301, 302]

В приведенных ранее результатах убедительно показано, что в условиях фотокатализа в присутствии сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ в водной дисперсии осуществляется синтез привитых сополимеров ММА на тресковый коллаген. При модификации исходного состава смеси путем введения известных модифицирующих добавок получен и охарактеризован фибриллярный гель, который может найти применение для использования в медицинской, фармацевтической, пищевой промышленности, в скаффолд-

технологиях и т.д. В то же время выявлено несколько побочных процессов по отношению к прививке ММА на коллаген: гомополимеризация ММА, прививка ММА на поверхность катализатора, образование продукта окисления ММА.

В данном разделе диссертации приведены данные о влиянии природы сложного оксида металлов на продукты фотокатализа в водной дисперсии ММА и морского коллагена и перспектив использования ряда сложных оксидов, как катализаторов получения новых полимерных трехмерных структур. В условиях, аналогичных процессу в присутствии сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, получены продукты взаимодействия ММА и трескового коллагена в водной дисперсии в присутствии фотокатализаторов - сложных оксидов разной природы: CsTeMoO_6 , RbNbTeO_6 , CsNbTeO_6 , NaVMoO_6 , KVMoO_6 , $\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.375}\text{O}_6$, $\text{CsNi}_{0.25}\text{W}_{1.75}\text{O}_6$, $\text{CsMn}_{0.25}\text{W}_{1.75}\text{O}_6$, $\text{CsCo}_{0.25}\text{W}_{1.75}\text{O}_6$, $\text{CsCu}_{0.25}\text{W}_{1.75}\text{O}_6$, Bi_2WO_6 , Bi_2MoO_6 . Выбор соединений не случаен. Ранее экспериментально доказано, что соединения могут генерировать гидроксильные радикалы [239-243].

Результаты элементного анализа выделенного из водной фазы полимера показали, что заметные изменения содержания азота в образцах в сравнении с исходным коллагеном имеют место только в случае четырех оксидов: NaVMoO_6 , KVMoO_6 , $\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.375}\text{O}_6$, CsTeMoO_6 (табл. 5). Это значит, что образование привитого сополимера коллаген-ПММА в заметных количествах проходит только в случае указанных сложных оксидов. Наряду с этим следует отметить, что при выбранном соотношении компонентов в реакционной смеси наблюдается и образование следовых количеств гомополимера ММА.

Таблица 5. Результаты анализа продуктов взаимодействия ММА и морского коллагена в присутствии разных фотокатализаторов

№	Катализатор	Азот, % среднее значение	Прививка на коллаген, %
1	Исходный коллаген	16,2	–
2	NaVMoO_6	14,7	~9
3	KVMoO_6	15,3	~6
4	$\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.375}\text{O}_6$	15,0	~7
5	CsTeMoO_6	15,6	~4

Методом СЭМ исследована поверхность порошков после синтезов (рис. 21). Прежде всего, интересно обсудить результаты для соединений NaVMoO_6 (рис. 21, а), CsTeMoO_6 (рис. 21, б) KVMoO_6 (рис. 21, в), $\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.375}\text{O}_6$ (рис. 21, г). Обращает на себя внимание тот факт, что, если в случае CsTeMoO_6 и $\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.375}\text{O}_6$ на фото СЭМ хорошо видны частицы катализатора (рис. 21, б и г, соответственно), или полимерные волокна за счет прививки фрагментов синтетического полимера на поверхность оксида, то на поверхности катализаторов NaVMoO_6 и KVMoO_6 частицы катализатора трудно рассмотреть (рис. 21, а, в), т.к. они покрыты слоем, скорее всего, органического полимера.

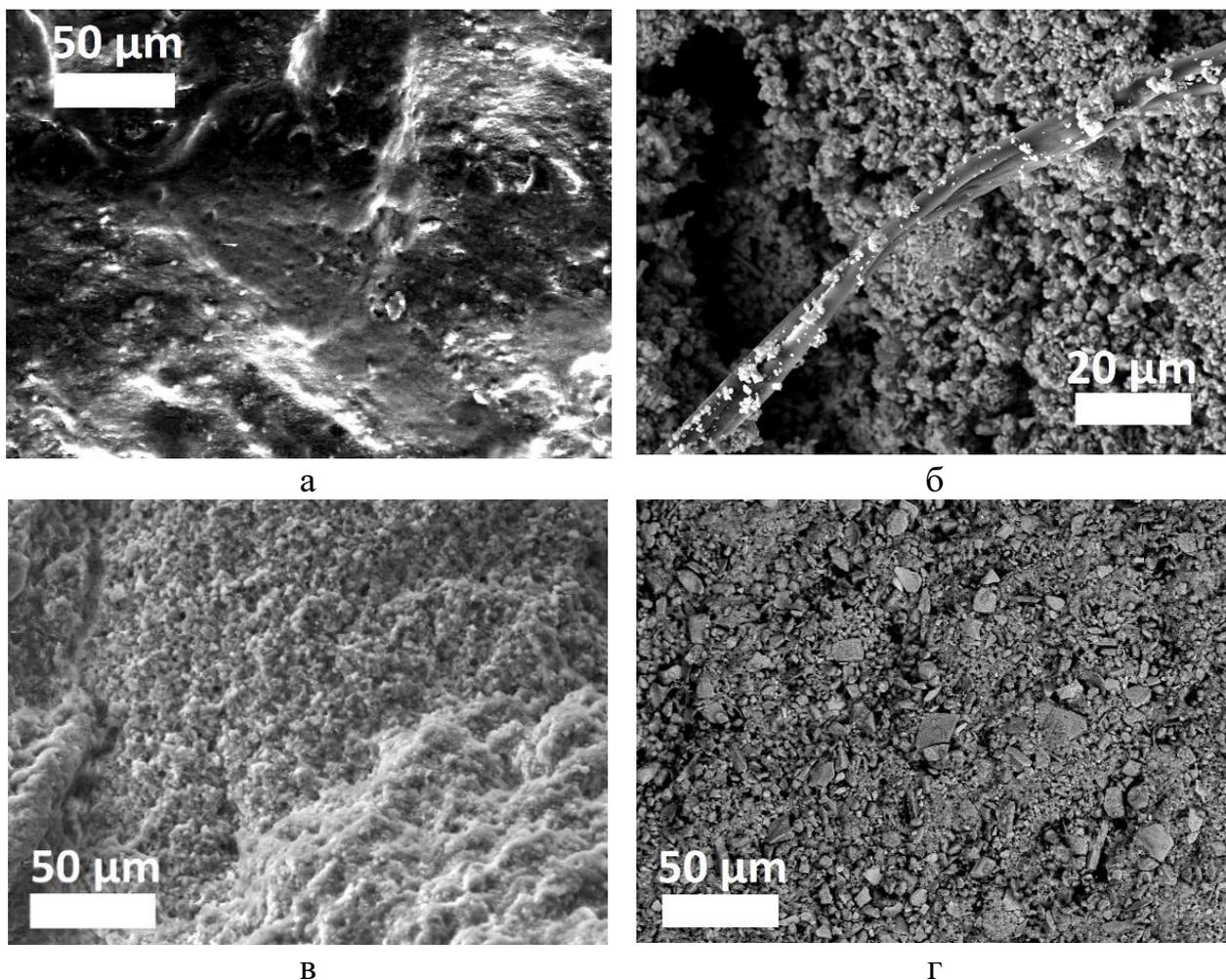
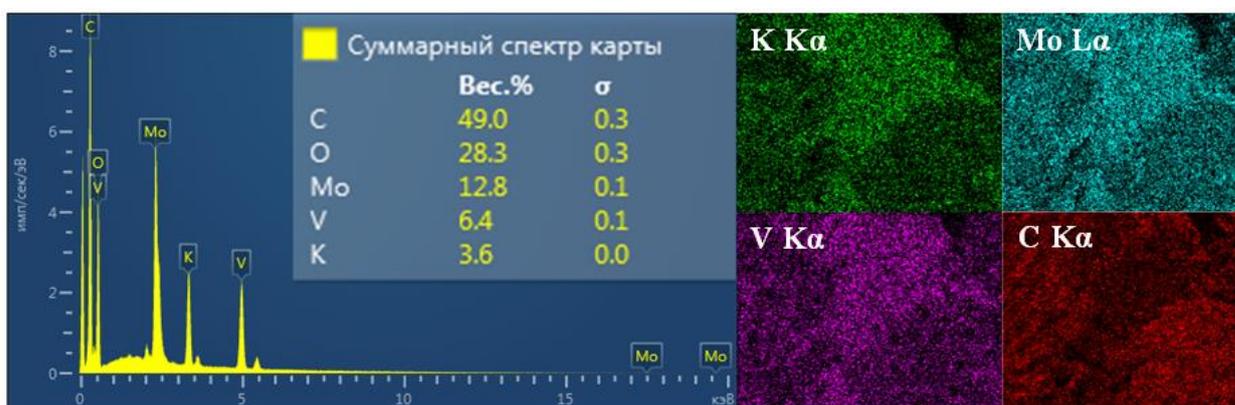
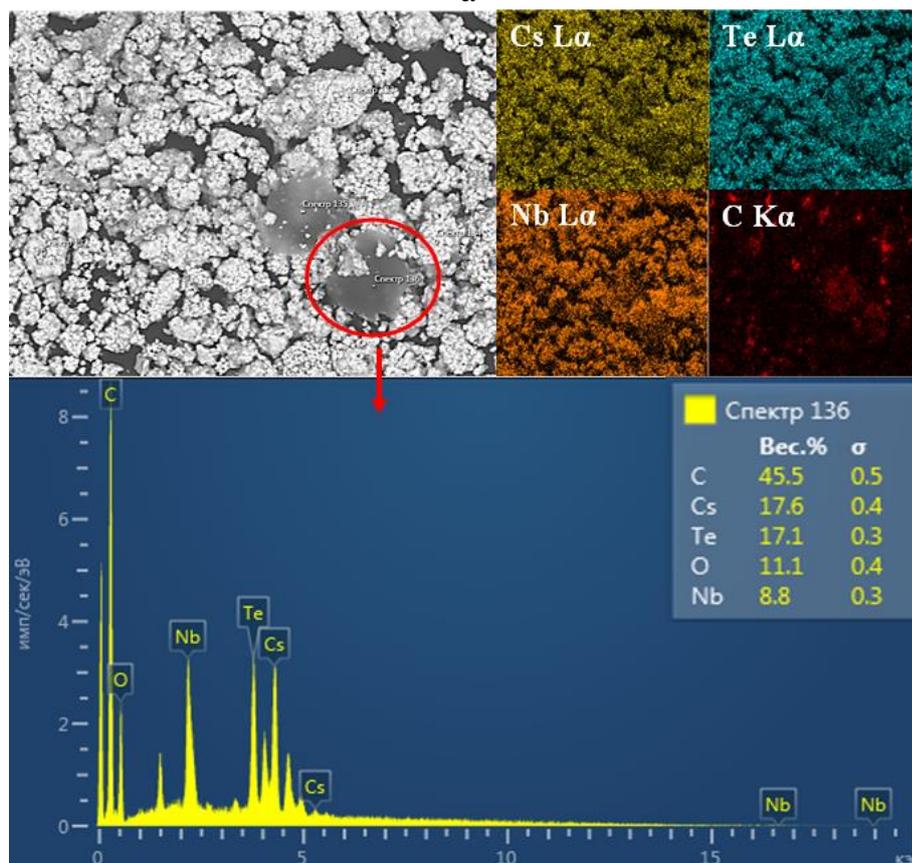


Рис. 21. Изображения СЭМ поверхности катализаторов после фотокатализа с коллагеном NaVMoO_6 (а), CsTeMoO_6 (б), KVMoO_6 (в), $\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.375}\text{O}_6$ (г)

Это предположение подтверждается картами распределения элементов по данным РМА поверхности катализаторов на примере KVMoO_6 , которые демонстрируют равномерное распределение углерода на поверхности, так же, как и элементов К, V, Мо, около 50% (рис. 22, а).



а



б

Рис. 22. Карты распределения элементов для фото СЭМ поверхности катализатора $KVMoO_6$ (а) и $CsNbTeO_6$ (б) после синтеза с коллагеном

Изображения СЭМ поверхности для катализаторов $CsNi_{0.25}W_{1.75}O_6$, $CsMn_{0.25}W_{1.75}O_6$, $CsCo_{0.25}W_{1.75}O_6$, $CsCu_{0.25}W_{1.75}O_6$ аналогичны $CsV_{0.625}Te_{1.375}O_6$, т.е. не содержат полимерных субстратов. В ряде случаев на поверхности катализаторов, в частности, для $CsNbTeO_6$ и $RbNbTeO_6$ после синтеза на изображениях СЭМ видны отдельные фрагменты полимерного продукта (рис. 23, а, б), как в случае $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ и $CsTeMoO_6$. Это подтверждается

картами распределения элементов по данным РМА поверхности катализатора на примере CsNbTeO_6 (рис. 22, б). Видно, что на поверхности наблюдается неравномерное распределение атомов углерода (С) в отличие от равномерного распределения металлов, входящих в состав катализатора.

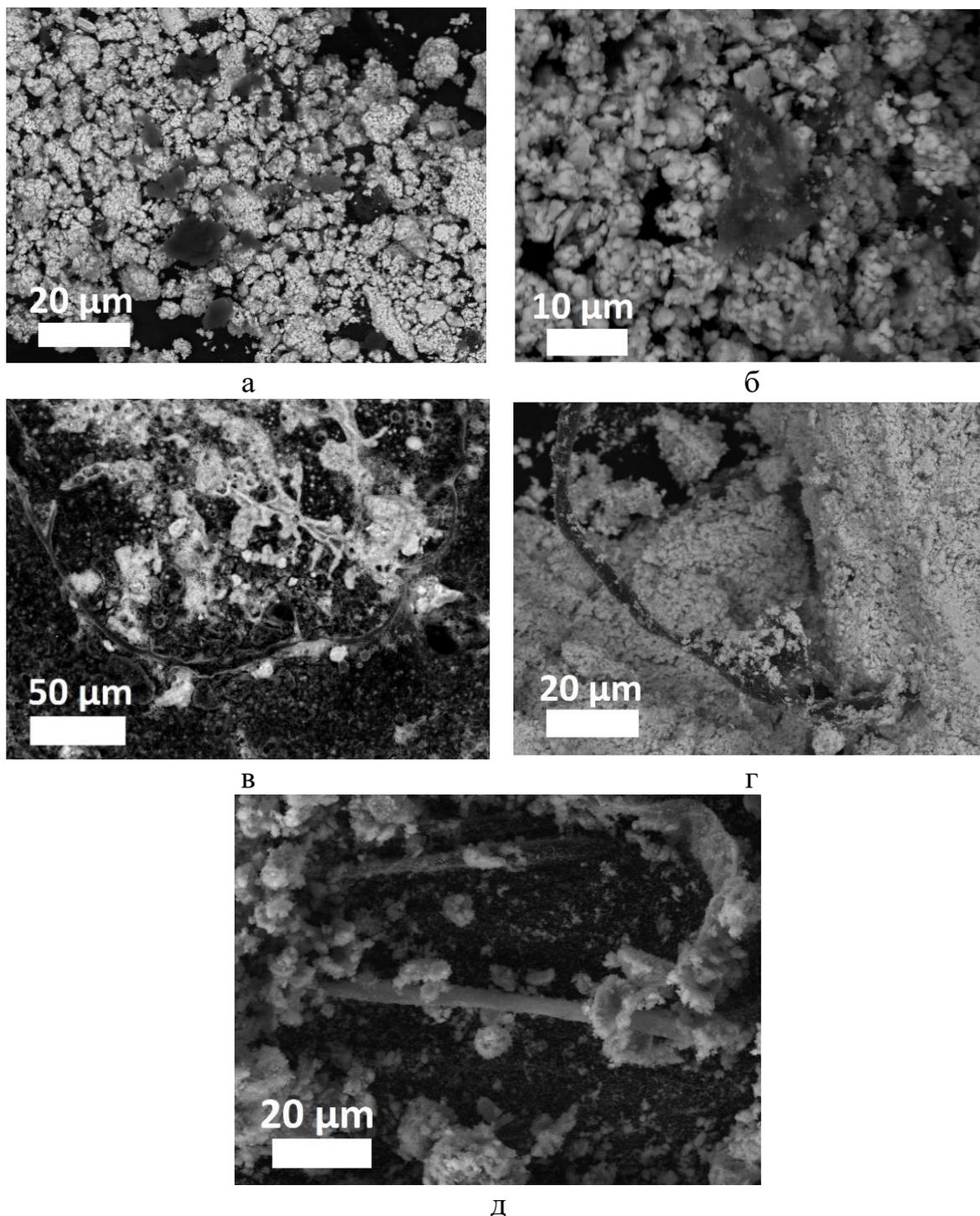


Рис. 23. Изображения СЭМ поверхности катализаторов после фотокатализа с коллагеном CsNbTeO_6 (а), RbNbTeO_6 (б) и без коллагена KVMoO_6 (в), Bi_2WO_6 (г) и Bi_2MoO_6 (д)

В серии экспериментов по фотокатализу с участием сложных оксидов Bi_2WO_6 , Bi_2MoO_6 , $\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.375}\text{O}_6$, KVMoO_6 и NaVMoO_6 в тех же условиях, что и ранее, но без введения коллагена в реакционную смесь, была предпринята попытка получить только полимерный продукт ОММА. В случае фотокатализа дисперсий с Bi_2WO_6 и Bi_2MoO_6 был выделен полимер (менее 1% конверсии) с молекулярной массой $M_n=620$ кДа и 900 кДа и $M_w/M_n = 3,4$ и 2,6, соответственно. В остальных случаях было выделено небольшое количество полимеров, что не позволило провести ГПХ анализ. Состав полимеров был проанализирован методом ЯМР ^1H (табл. 6).

Таблица 6. Результаты ЯМР ^1H анализа полимеров

№	Катализатор	Содержание компонентов, масс. %		
		ПММА	Полимер ОММА	ОММА
1	$\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.375}\text{O}_6^*$	62	38	-
2	$\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.375}\text{O}_6^{**}$	-	18	82
3	KVMoO_6^*	76	24	-
4	NaVMoO_6^*	91	9	-
5	NaVMoO_6^{**}	-	10	90
6	Bi_2WO_6^*	100	-	-
7	$\text{Bi}_2\text{WO}_6^{**}$	43	42	15
8	$\text{Bi}_2\text{MoO}_6^*$	78	22	-
9	$\text{Bi}_2\text{MoO}_6^{**}$	-	16	84
10	$\text{Bi}_2\text{MoO}_6^*$ (гексан)	-	100	-
11	$\text{Bi}_2\text{MoO}_6^{**}$ (гексан)	-	67	33

* полимер из органической фазы

** полимер, отмытый с катализатора хлороформом в Сокслете

Интересно, что на поверхности катализаторов Bi_2WO_6 , Bi_2MoO_6 и KVMoO_6 после синтеза методом СЭМ были обнаружены фрагменты органического полимера, причем, в отличие процесса с участием коллагена, на поверхности катализатора видны однородные нитевидные фрагменты

(рис. 23, в-д).

Экстракцией порошков катализаторов после синтеза в аппарате Сокслета хлороформом и высаживанием органической фазы синтеза в случае сложных оксидов Vi_2WO_6 , Vi_2MoO_6 , $\text{CsV}_{0.625}\text{Te}_{1.375}\text{O}_6$, KVMoO_6 и NaVMoO_6 удалось выделить незначительные количества твердых продуктов. Эти продукты были проанализированы методом ЯМР-спектроскопии (табл. 6).

Для полимеров в спектре ЯМР ^1H наблюдали сигналы: синглеты при 4.69 и 8.10 м.д. с соотношением интенсивностей 1:1, которые относятся к ОММА (схема 9) и сигналы в области 0.95-2.50 м.д. и 3.65 м.д., которые относятся к ПММА, сигналы в области 1.22-1.42 м.д., 3.57-3.72 и 4.32 м.д., которые относятся к полимеру ОММА.

Из таблицы 6 следует, что в случае катализаторов, на которых идет прививка на коллаген в водной дисперсии с ММА (см. табл. 5), при проведении процесса без коллагена имеет место образование очень небольших количеств полимеров ММА и ОММА в органической фазе синтеза и отсутствует мономер ОММА (табл. 6, строки 1, 3, 4), а на катализаторе идентифицируется только мономер и полимер ОММА (табл. 6, строки 2, 5). В то же время в случае Vi_2WO_6 и Vi_2MoO_6 на катализаторе обнаружены мономер и полимер ОММА, но в разных соотношениях, а для Vi_2WO_6 еще и ПММА (табл. 6, строки 7, 9). В органической же фазе синтеза на Vi_2WO_6 образуется только ПММА, а на Vi_2MoO_6 еще небольшое количество полимера ОММА (табл. 6, строки 6, 8). Интересно, что добавление гексана, растворителя ММА, осадителя ПММА и, видимо, ОММА и ПОММА, в реакционную смесь синтеза дисперсии ММА с водой и катализатором Vi_2MoO_6 привело к тому, что в органической фазе образовался только полимер ОММА (табл. 6, строка 10).

Хотелось бы обратить внимание на тот факт, что в присутствии ряда сложных оксидов прививка ММА на коллаген практически не имела места, хотя гидроксильный радикал соединения могут генерировать, как отмечалось ранее [239-243]. Вероятнее всего, это связано с заметной адсорбцией ММА

на поверхности катализатора при фотокатализе, параллельно протекающим окислением MMA до OMMA и последующей полимеризацией мономеров. Образовавшийся полимер удерживается на катализаторе за счет двойных связей мономера и вакантных орбиталей металла. Равновероятной считается координация по карбонильной группе и двойной связи мономера [303-305]. Видимо, в этом случае процесс взаимодействия электронно-дырочных пар с водой становится стерически затруднительным, и образование гидроксильного радикала практически прекращается. Кроме того, увеличение пути миграции электрона по цепи молекул полимеров от катализатора к радикальному центру в растворе увеличивает вероятность рекомбинации пары электрон-дырка. Это приводит к резкому уменьшению количества активных частиц и образующихся радикалов, а, следовательно, к замедлению и остановке реакции полимеризации в растворе [306]. Очевидно, что природа катализатора оказывает влияние на соотношение возможных превращений MMA в условиях фотокатализа: в ряде случаев (для катализаторов $RbNbTeO_6$, $CsNbTeO_6$, $CsNi_{0.25}W_{1.75}O_6$, $CsMn_{0.25}W_{1.75}O_6$, $CsCo_{0.25}W_{1.75}O_6$, $CsCu_{0.25}W_{1.75}O_6$, исследованных в данной работе) целевой продукт – привитой полимер акрилата на коллаген не образуется, не смотря на зафиксированные ранее для них гидроксильные радикалы [241, 242].

Схематически реакции в смеси катализатора с мономером, в том числе в присутствии природного полимера, представлены на рис. 24.

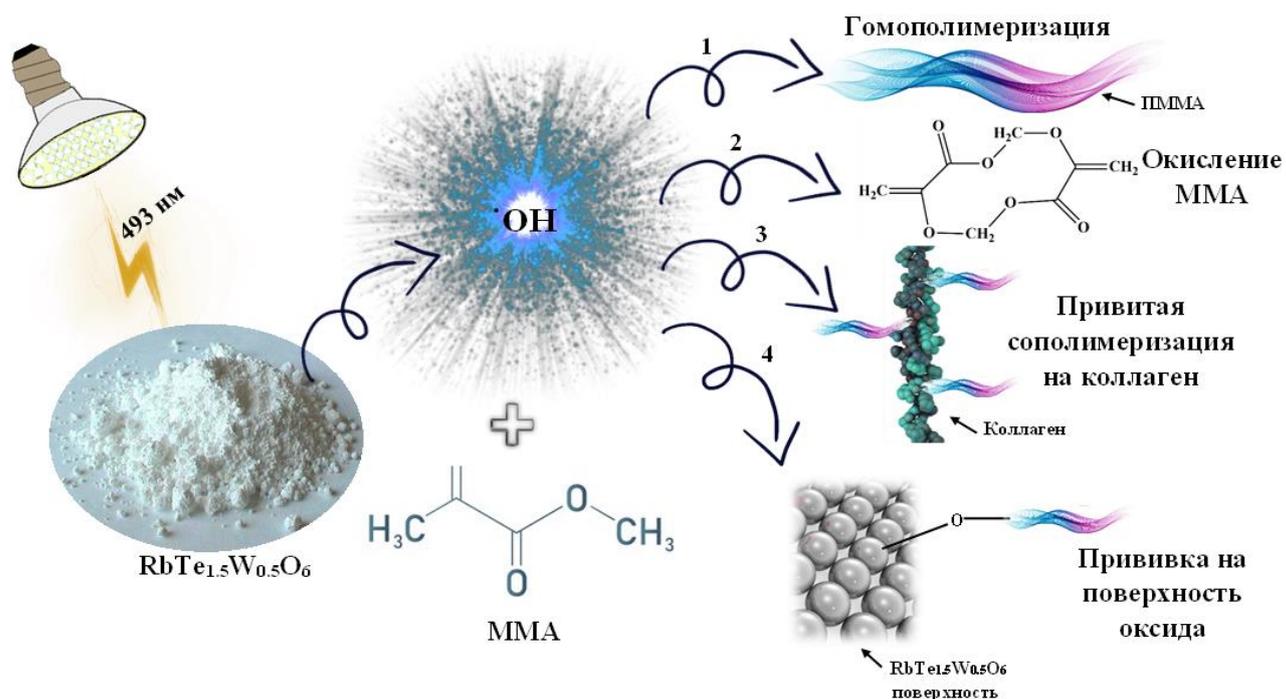


Рис. 24. Схемы различных направлений взаимодействия образованных радикалов с субстратом

3.1.5. Контроль изменений поверхности сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ методом РФЭС после катализа полимеризации [306]

Особое внимание при разработке новых способов получения полимерных материалов заслуживает неоднократное использование катализатора. Такие исследования проведены для многих катализаторов, имеющих практическую направленность исследований. Так, например, повторное использование катализаторов $\text{Ag}_3\text{PO}_4\text{-Guar gum}$ [307], $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CeO}_2/\text{g-C}_3\text{N}_4$ [308], $\text{SiO}_2/\text{WO}_3\text{-TiO}_2@\text{rGO}$ [309] возможно для нескольких циклов с небольшой потерей активности после обработки растворителем и обжига. Соответственно, изучение возможности повторного использования сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ является актуальным при изучении его как фотокатализатора в полимеризационных процессах.

В данной работе проведен цикл исследований по повторному использованию катализатора $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ после процесса полимеризации. С целью более глубокого анализа поверхности сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ и

изучения адсорбции органических субстратов при фотокатализе в гетерогенной смеси $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ и эмульсии ММА в воде при облучении видимым светом $\lambda = 400\text{-}700$ нм при температуре $20\text{-}25^\circ\text{C}$ использовали метод РФЭС, который позволяет качественно и количественно определить химический состав соединений на приповерхностном слое толщиной 1-2 нм.

В связи с поставленной целью необходимо было провести детальное исследование поверхности порошка катализатора и испытания его после реакции фотокатализа для повторного использования. Для достижения этой цели проводили полимеризацию ММА из эмульсии с использованием фотокатализатора. Для исследования особенностей процессов, протекающих на поверхности, порошок катализатора после реакции был подвергнут разным способам очистки.

Анализ порошка катализатора после реакции полимеризации ММА методом СЭМ показал присутствие на поверхности значительного количества волокон полимера с длиной до 200-700 мкм, а также менее крупные органические частицы размером 5-10 мкм (рис. 25).

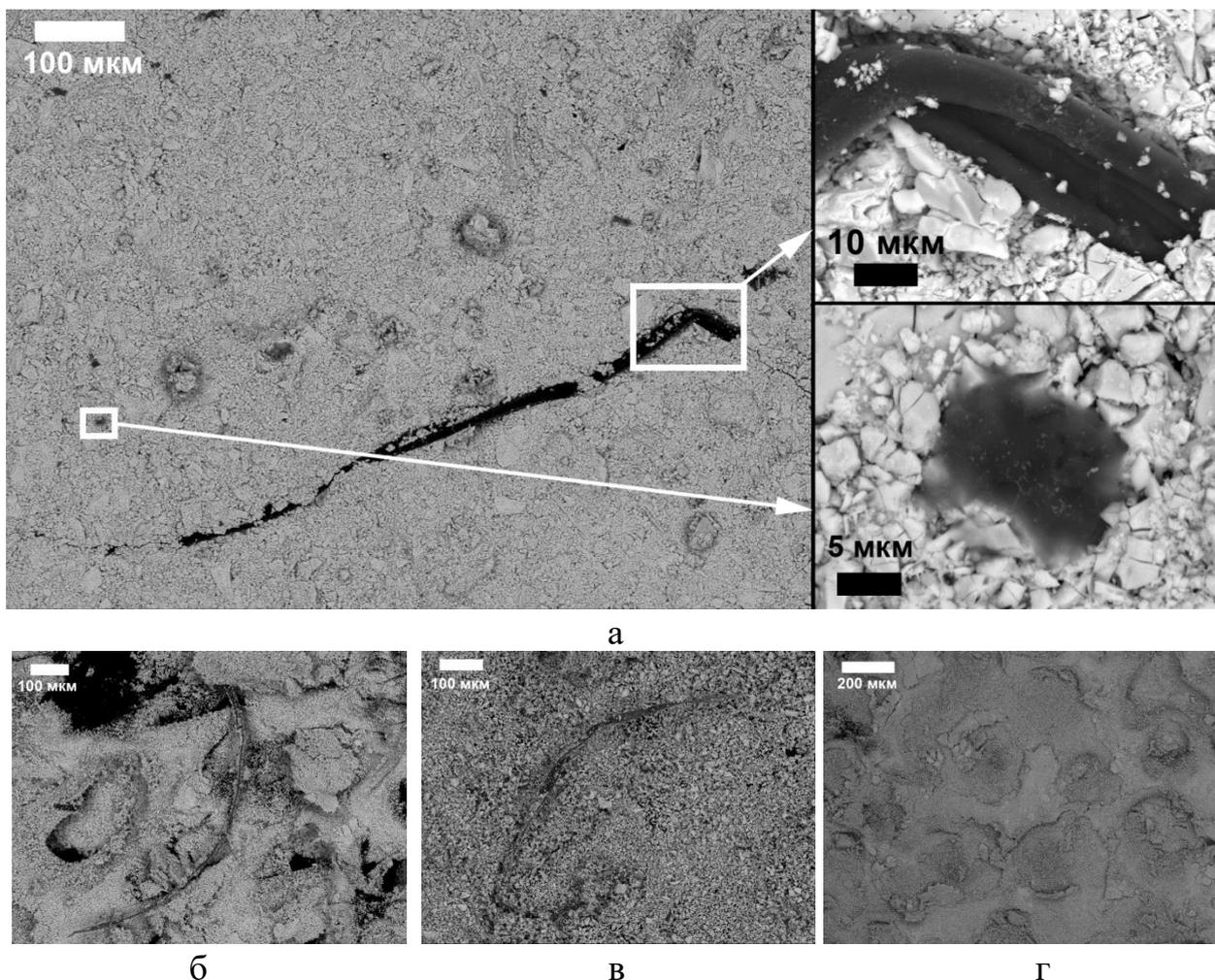


Рис. 25. Макромолекулы полимера на поверхности порошка катализатора $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ после проведения реакции полимеризации MMA (а); поверхность порошка катализатора $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ после отмывания ПММА в ТГФ (б), CHCl_3 (в) и в воде в УЗДН (г)

Исследование поверхности порошка катализатора методом СЭМ после промывания в ТГФ и CHCl_3 показало наличие волокон полимера и органики (рис. 25, б, в). Однако после очистки в воде с помощью ультразвука в УЗДН и последующей сушке в вакууме волокна полимера на поверхности оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ не идентифицированы методом СЭМ (рис. 25, г).

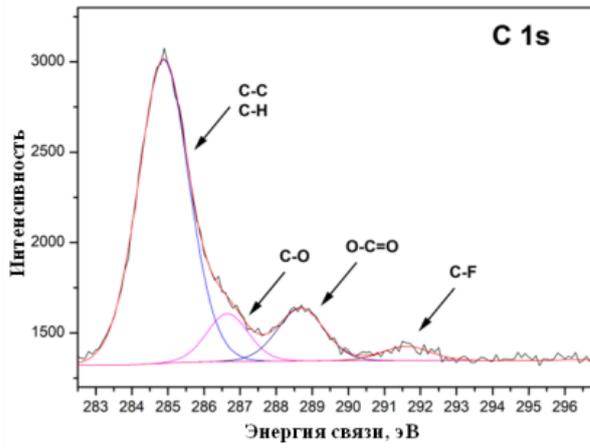
Тем не менее, этот порошок при повторном использовании показал значительное падение его эффективности в синтезе полимера на основе MMA. При повторном использовании после обработки порошка катализатора ультразвуком в течение 40 мин в присутствии воды при 20°C и высушивании его в вакууме выделен полимер с конверсией менее 5% (при использовании

свежего порошка из реакционной смеси удастся выделить ~ 5-10% полимера) [310]. Очевидно, что изменение эффективности фотокатализатора связано с изменением поверхности оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, которые не идентифицируются методом СЭМ.

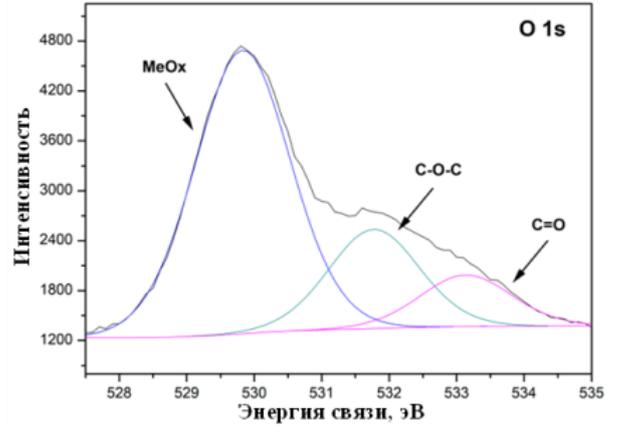
Более глубокое исследование поверхности порошка $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ после всех перечисленных способов очистки методом РФЭС показало, что в случае всех образцов $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ наблюдается смещение фотоэлектронных линий металлов Rb, Te, W в сторону больших энергий связи, относительно свежеполученного соединения. Такое смещение может охарактеризовать их поверхностные связи как преимущественно соединенные с кислородом, то есть все атомы на поверхности после процесса полимеризации и проведенной очистки находятся в окисленном состоянии в виде «М-О-».

Разложение фотоэлектронных линий углерода C 1s и кислорода O 1s показало, что на поверхности образца порошка, отмытого в ультразвуковом диспергаторе, присутствует химически адсорбированный ММА и его олигомеры: вклады связей C-C (285 эВ), C-C=O (285,75 эВ), C-O (286,7 эВ), O-C=O (289,1 эВ) соотносятся как 2,4:1:0,7:0,4 (рис. 26, а, б, табл. 7). Небольшое изменение соотношения пиков по сравнению с чистым ММА (2:1:1:1) в линии C 1s происходит из-за влияния металлов соединения $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, связанных через кислород с углеродом молекулы ММА, на распределение электронной плотности по ее связям. Кроме химических связей ММА, на поверхности фотокатализатора присутствует небольшой избыток связей C=O, а также на уровне примесей наблюдаются калий (в виде дублета), который попал на поверхность катализатора из эмульгатора, и C-F связи, связанные с хранением образцов в полиэтиленовых пакетах. Таким образом, хотя обработка порошка ультразвуком приводит к разрушению крупных, связанных с катализатором, макромолекул, наблюдаемых методом СЭМ, мономер и олигомеры, образующиеся при разрушении макромолекул ультразвуком, образуют с катализатором химические связи и остаются на его поверхности. При этом макромолекулы полимеров не идентифицируются,

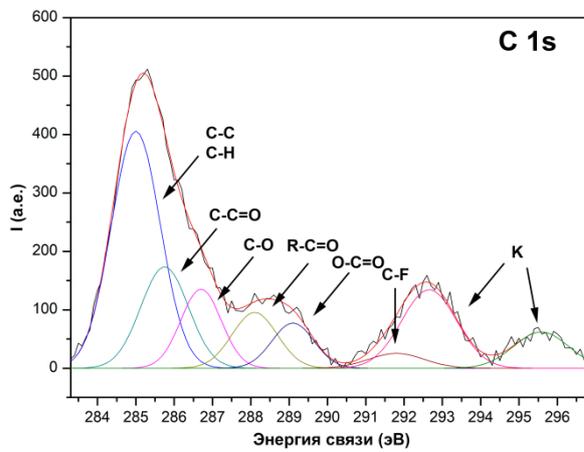
как и при анализе методом СЭМ.



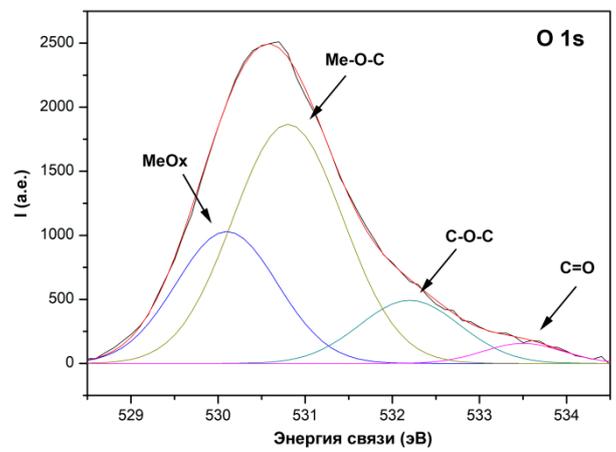
а



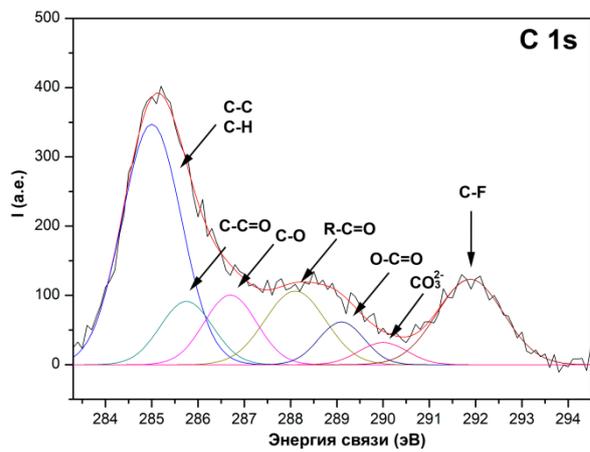
б



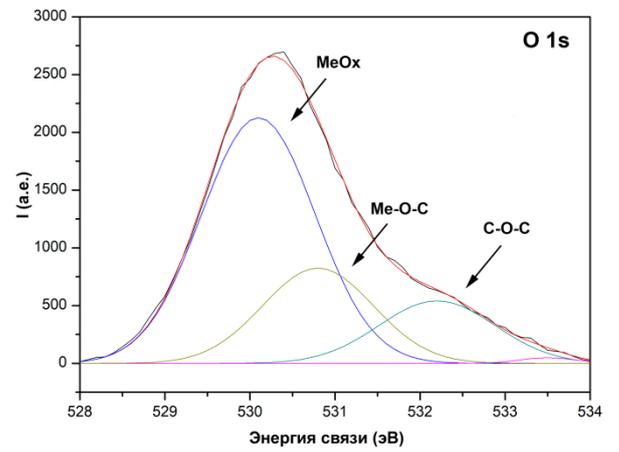
в



г



д



е

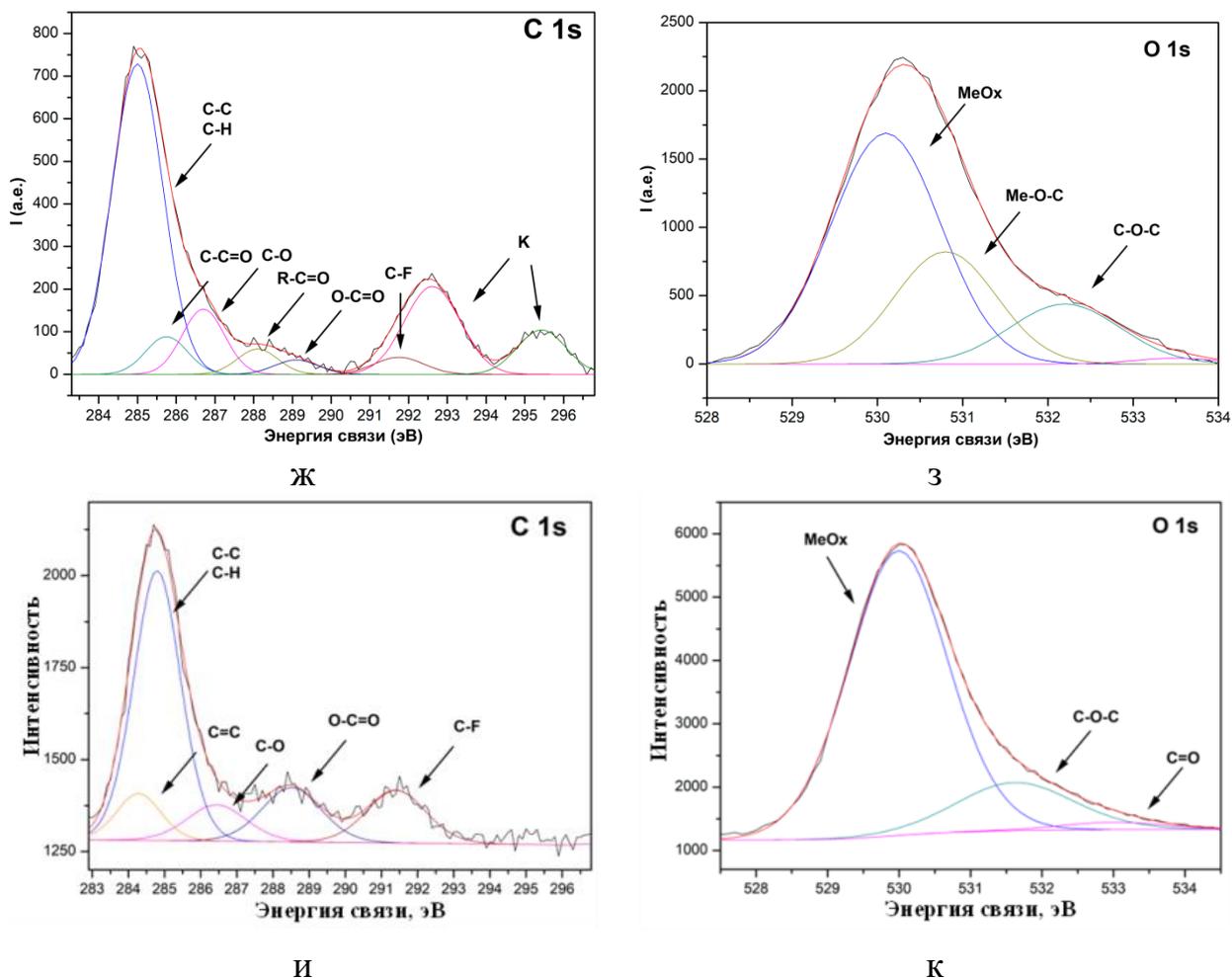


Рис. 26. Разложение фотоэлектронных линий C 1s и O 1s для образцов катализатора исходного (а, б), после УЗ обработки (в, г), после промывания в CH_3Cl (д, е), ТГФ (ж, з) после обжига 300–400°C (и, к)

После длительного промывания в хлороформе при температуре кипения (61°C) порошок фотокатализатора сразу после синтеза полимера также анализировали методом РФЭС. В этом случае фотоэлектронная линия углерода при разложении дает распределение интенсивностей вкладов связей, не соответствующее ММА. Так, происходит значительное увеличение вклада связей C=O и C-O-R и появление групп CO_3^{2-} на поверхности порошка (рис. 26, в, г, табл. 7), которые можно отнести к полимерным молекулам. Это свидетельствует о том, что, несмотря на длительную экстракцию хлороформом, полимеры ММА и ОММА, образующиеся в реакционной смеси, остаются адсорбированными на поверхности катализатора. Это подтверждает анализ методом СЭМ: полимерные цепи обнаруживаются на

поверхности порошка (рис. 25, в). Хотя, часть таких макромолекул переходит в раствор хлороформа: в работе [272] отмечалось, что в хлороформе после промывания порошка фотокатализатора методами ЯМР ^{13}C и МАЛДИ также были идентифицированы полимеры MMA и OMMA

Таблица 7. Вклады связей в фотоэлектронную линию углерода C 1s для исследованных образцов

Тип химической связи	E, эВ	Порошок RbTe_{1.5}W_{0.5}O₆ после УЗДН, %	Порошок RbTe_{1.5}W_{0.5}O₆ после CHCl₃, %	Порошок RbTe_{1.5}W_{0.5}O₆ после ТГФ, %
C-C, C-H	285	48,19	49,88	72,48
C-C=O	285,75	20,08	11,48	7,22
C-O	286,7	13,34	12,68	12,67
O-C=O	289,1	7,90	6,70	2,86
C=O	288,1	10,49	15,55	4,77
CO ₃ ²⁻	290	-	3,71	-

После промывания порошка раствором ТГФ полимерные молекулы (рис. 25, б) видны на СЭМ изображениях, однако методом РФЭС на поверхности катализатора не идентифицируются. На поверхности также распознается калий из эмульгатора (рис. 26, д, е, табл. 7). Доля связей C-C и C-H на поверхности фотокатализатора увеличивается значительно по сравнению с двумя другими образцами. Вероятно, в данном случае избыток ТГФ адсорбируется на поверхности катализатора с открытием кольца по схеме на рис. 27, предложенной в работе [311].

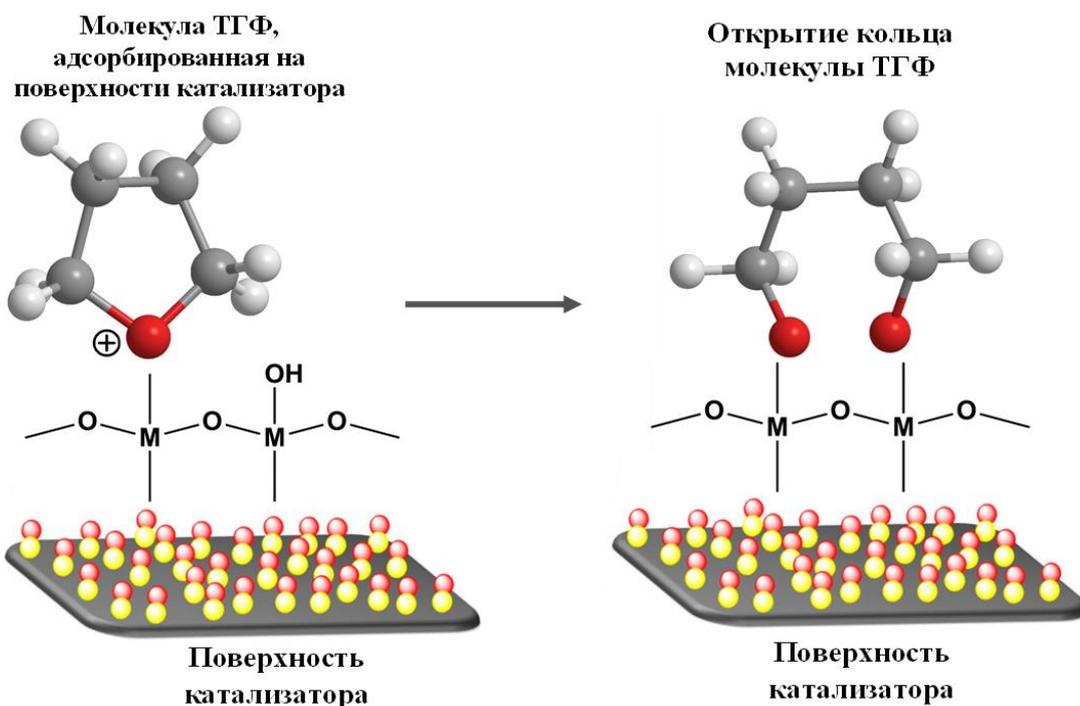


Рис. 27. Механизм адсорбции молекулы ТГФ на поверхности катализатора

Исследование состава образцов катализатора по глубине при ионном профилировании показывает, что уже после 2-4 нм адсорбированные мономеры и олигомеры в линии C 1s отсутствуют. В фотоэлектронной линии O 1s также отсутствуют вклады связей C-O и C=O. Это говорит о том, что молекулы MMA и олигомеры адсорбируются только на поверхности катализатора и формируют слой толщиной не более 1-2 нм.

В целом следует выделить следующие особенности изменений на поверхности сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ после катализа полимеризации MMA: из предыдущего исследования поверхности и фотокаталитических свойств $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ известно, что поверхность соединения обогащена атомами Rb, за счет их миграции из объема на поверхность по каналам кристаллической решетки [271]. Это приводит к возникновению небольшого положительного заряда на поверхности частиц порошка, который в водном растворе хорошо адсорбирует воду и OH^- . Таким образом, поверхность $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ в растворе имеет частично отрицательный заряд, что подтверждается повышенной адсорбцией поверхностью катализатора катионных красителей [226]. Поверхность может иметь вид, показанный на

рис. 28. Кроме того, на поверхности присутствуют атомы Te и W, которые также способны адсорбировать воду с образованием $-(\text{Te}/\text{W})-\text{OH}$ и $-(\text{Te}/\text{W})-\text{O}^-$, однако их вклад в поверхностное состояние меньше.

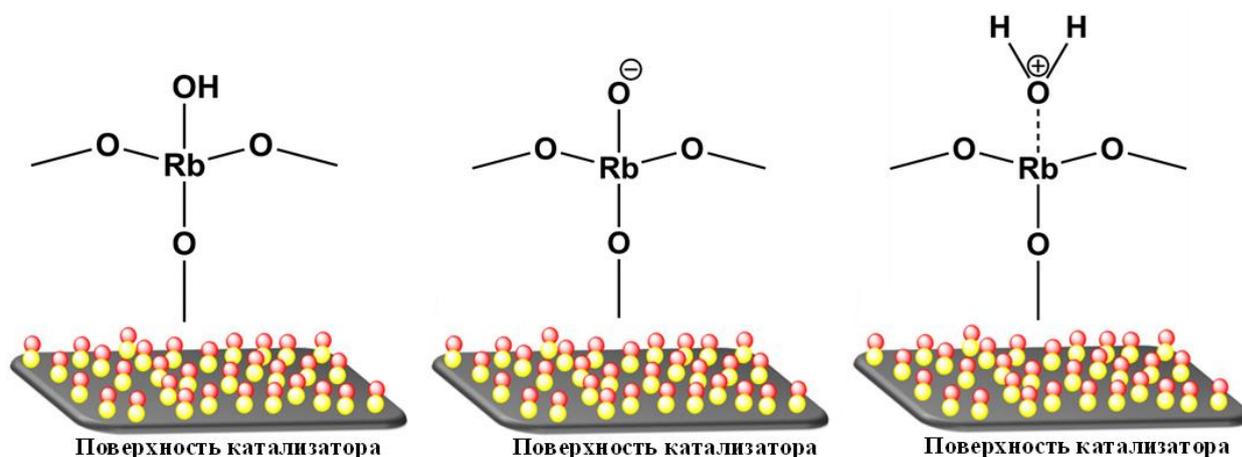


Рис. 28. Виды адсорбированных частиц на поверхности катализатора в водном растворе

После реакции полимеризации атомы металлов на поверхности $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ находятся в окисленном состоянии. Это означает, что активные центры $-\text{M}-\text{O}^\bullet$, с которых начинался процесс радикальной полимеризации, заняты. После обработки порошка ультразвуком разрушаются макромолекулы полимера, при этом по-прежнему олигомеры могут занимать активные центры $-\text{M}-\text{O}^\bullet$. Кроме того, за счет кратных связей в мономере и полимере имеет место взаимодействие органических субстратов со сложным оксидом $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ с образованием координационных комплексов [303-305], которые препятствуют выходу гидроксильных радикалов в объем раствора мономера. Эти особенности в реакционной смеси объясняют небольшой выход полимера (5-10 %) в растворе после реакции. Вероятно, при образовании и росте цепи олигомеров MMA и OMMA на поверхности катализатора процесс взаимодействия электронно-дырочных пар с растворителем-водой становится стерически затруднительным, и реакции радикалообразования практически прекращаются. С другой стороны, увеличение пути миграции электрона по цепи молекул полимера от катализатора к радикальному центру в растворе увеличивает вероятность

рекомбинации пары электрон-дырка. Это приводит к резкому уменьшению количества активных частиц и образующихся радикалов, а, следовательно, к замедлению и остановке реакции полимеризации на поверхности и в растворе.

Таким образом, для регенерации фотокатализатора $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ обработка его водного раствора ультразвуком не достаточна для использования повторно. Это показали исследования РФЭС, а также снижение эффективности процессов полимеризации MMA и прививки MMA на коллаген.

Для удаления органических молекул с поверхности катализатора использовали обжиг его при температуре $300\text{-}400^\circ\text{C}$ после ультразвуковой обработки. После такой обработки катализатора проведение процесса полимеризации MMA приводит к выделению полимера с конверсией $\sim 5\text{-}10\%$, т.е. практически такой же, как со свежим катализатором.

3.2. Ферментативный катализ в биоразрушении белковых структур

Нативный коллаген имеет нитевидную, а не трехмерную структуру, и, благодаря своей белковой природе, представляет собой быстро биоразлагаемый под действием ферментов материал [80, 312-320]. В случае практического использования скаффолдов на основе коллагена/желатина важно знать, насколько быстро произойдет его разрушение. Важно, чтобы процесс происходил во времени, а скаффолд разрушался по мере выздоровления ткани. Результаты исследований об особенностях гидролиза ТК в присутствии разных протеолитических ферментов и сополимеров трескового коллагена с ПММА представлены в следующем разделе диссертации.

3.2.1. Особенности ферментативного гидролиза трескового коллагена разными протеолитическими ферментами [321-323]

Ферментативный гидролиз ТК (1%-ный водный раствор) в сравнимых условиях проводили, используя различные по природе и происхождению

протеолитические ферменты: панкреатин, тромбин, трипсин при трех фермент-субстратных соотношениях коллаген : фермент (10:1, 10²:1, 10³:1).

Независимо от природы фермента, высокомолекулярный тресковый коллаген гидролизуется преимущественно до низкомолекулярной фракции с $M_w \sim 9$ кДа (более 75%) сразу после первой минуты наблюдения и сохраняется в течение всего процесса. Также во всех образцах присутствует фракция с $M_w \sim 17-18$ кДа, однако содержание ее различно в зависимости от используемого фермента: в случае тромбина доля ее составляет меньше 5%, тогда как при использовании панкреатина и трипсина – больше 5%. В случае же гидролиза трипсином появляется еще олигомерная фракция ($M_w \sim 300$ Да), но ее доля невелика, и со временем исчезает, видимо, за счет разрушения до аминокислот, неконтролируемых методом. С другой стороны, при гидролизе тромбином сохраняется также высокомолекулярная фракция с $M_w > 100$ кДа (>10%), в течение всего процесса, причем ее ММ не уменьшается, а доля составляет 18% после трех суток. В табл. 8 изменения молекулярно-массовых параметров ТК продемонстрированы на примере протеолитического разрушения панкреатином с фермент-субстратным соотношением коллаген : фермент = 10:1.

Таблица 8. Молекулярно-массовые параметры трескового коллагена при гидролизе панкреатином в течение 3-х суток (соотношение коллаген : панкреатин = 10:1)

№ п/ п	Значения параметров за время гидролиза									
	мин								3 суток	
	1		10		60		120			
	M_w , кДа	Доля, %	M_w , кДа	Доля, %	M_w , кДа	Доля, %	M_w , кДа	Доля, %	M_w , кДа	Доля, %
1	39	13	37	13	27	10	23	7	-	-
2	18	4	18	3	17	4	18	5	17	6
3	9	84	9	84	9	86	9	88	9	94

На рис. 29 представлены кривые ММР гидролиза ТК различными ферментами в течение 3-х суток (фермент-субстратное соотношение

коллаген : фермент = 10:1).

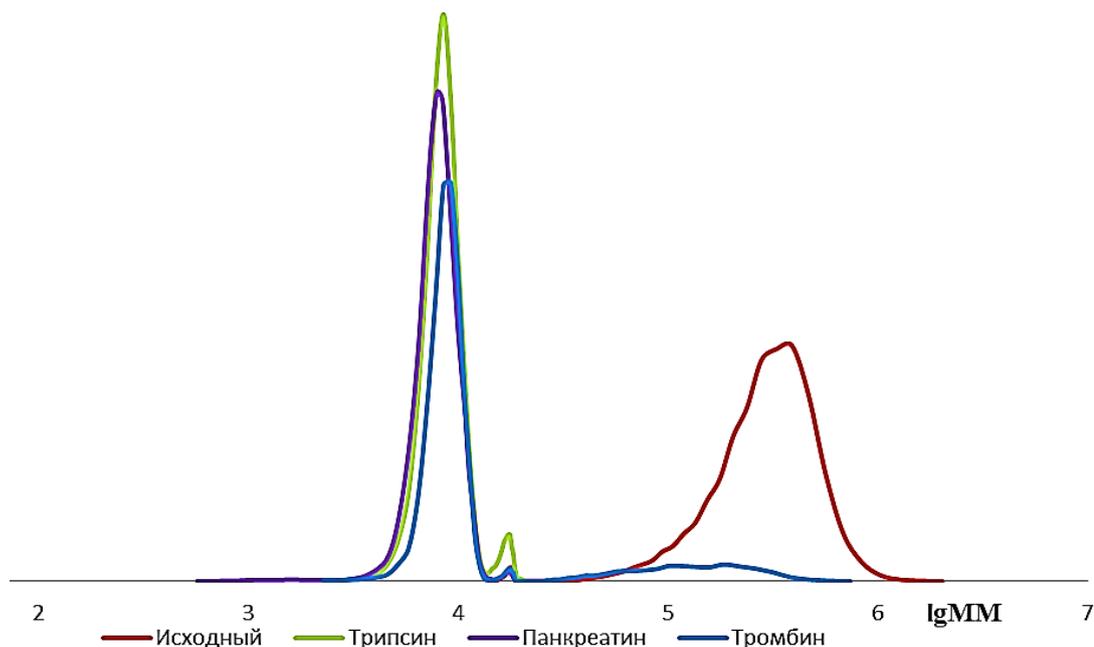


Рис. 29. Кривые ММР после гидролиза исходного коллагена трипсином, панкреатином и тромбином после 3-х суток

Из данных кривых видно, что все ферменты разрушают ТК аналогичным образом с образованием преимущественно двух низкомолекулярных фракций. Различаются только соотношения этих фракций.

Далее для оценки влияния концентрации используемого фермента на гидролиз морского коллагена был проведен ферментативный гидролиз ТК панкреатином и тромбином при трех различных соотношениях коллаген : фермент ($10:1$, $10^2:1$, $10^3:1$).

Оказалось, что основная часть ТК также гидролизует в течение первой минуты, независимо от количества фермента. При использовании панкреатина (например, соотношение коллаген : панкреатин = $10^2:1$, табл. 9) после первой минуты высокомолекулярный ТК ($M_w \sim 250-300$ кДа) для исходного полимера отсутствует в растворе, при этом появляются три фракции гидролизата с молекулярной массой $M_w \sim 40$ кДа (15%), $M_w \sim 17$ кДа (2%) и $M_w \sim 8$ кДа (83%). Контроль долей фракций в течение трех суток с разными интервалами времени показал, что при продолжении гидролиза

изменение доли фракций происходит медленно. Содержание первой фракции уменьшается вдвое через 2 ч, при этом значения M_w и коэффициента полидисперсности уменьшаются, и чем выше концентрация фермента, тем ниже значение M_w и меньше коэффициент полидисперсности (M_w/M_n уменьшается со значений 2,0-1,5 до 1,2). Эта фракция полностью исчезает через трое суток при выбранной максимальной концентрации панкреатина и составляет ~2% и ~9% при соотношении коллаген : фермент $10^2:1$ и $10^3:1$, соответственно. Что касается двух других фракций, то значения M_w и коэффициента полидисперсности ($M_w/M_n \sim 1,1$) для них не изменяются и имеет место тенденция к небольшому увеличению их доли в растворе в соответствии с уменьшением концентрации первой фракции. В таблице 9 представлены эти изменения для образца ТК с использованием панкреатина.

Таблица 9. Молекулярно-массовые параметры трескового коллагена при гидролизе панкреатином в течение 3-х суток (соотношение коллаген : панкреатин = $10^2:1$)

Продолжительность гидролиза, мин	Полимерная фракция					
	Первая		Вторая		Третья	
	M_w , кДа	Доля, %	M_w , кДа	Доля, %	M_w , кДа	Доля, %
1	41	15	17	2	8	83
10	40	15	17	3	9	82
60	35	18	17	3	9	80
120	33	14	17	4	9	82
3 сут	21	2	17	10	9	88

Вид кривых ММР трескового коллагена в растворе после гидролиза панкреатином в течение трех суток для всех выбранных концентраций в сравнении с исходным нативным образцом представлены на рисунке 30.

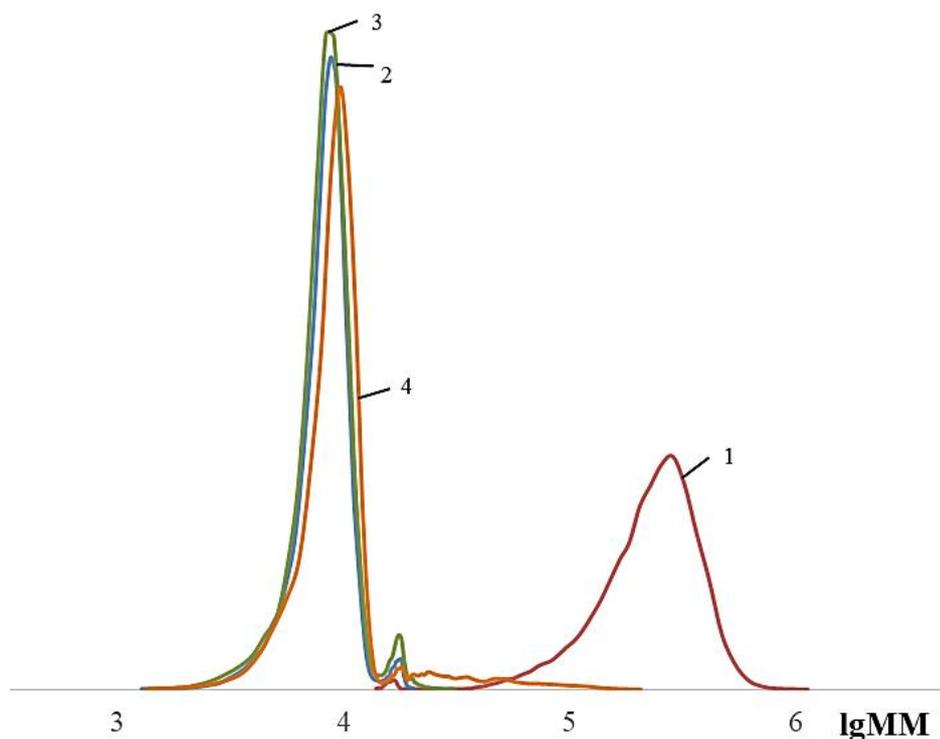


Рис. 30. Кривые ММР образца исходного коллагена (1), коллагена после 3-х суток гидролиза панкреатином при массовом соотношении коллаген : панкреатин 10:1 (2), 10^2 :1 (3), 10^3 :1 (4)

Аналогичные закономерности наблюдаются и при гидролизе ТК в присутствии фермента тромбина. Так, исходный ТК ($M_w \sim 250-300$ кДа) после первой минуты также отсутствует в растворе, при этом появляются три фракции гидролизата с $M_w \sim 130$ кДа (15%), с $M_w \sim 18$ кДа (2%) и $M_w \sim 10$ кДа (83%) (например, соотношение коллаген : тромбин = 10^2 :1, табл. 10). Однако ММ наиболее высокомолекулярной фракции более чем в два раза выше, коэффициент полидисперсности ее чуть больше ($2,2 > M_w/M_n > 1,5$), чем в случае использования панкреатина. Что касается двух других фракций, то значения M_w и коэффициента полидисперсности ($M_w/M_n \sim 1,1$) для них такие же, как и при гидролизе панкреатином. Контроль концентраций фракций в течение трех суток с разными интервалами времени показал, что при продолжении гидролиза изменения практически не происходят. В таблице 10 представлены изменения ММ в случае гидролиза ТК тромбином.

Таблица 10. Молекулярно-массовые параметры трескового коллагена при гидролизе тромбином в течение 3-х суток (соотношение коллаген : тромбин = 10^2 :1)

Продолжительность гидролиза, мин	Полимерная фракция					
	Первая		Вторая		Третья	
	M_w , кДа	Доля, %	M_w , кДа	Доля, %	M_w , кДа	Доля, %
1	127	15	18	2	10	83
10	126	16	18	2	9	82
60	124	16	18	2	10	82
120	125	16	18	1	10	82
3 сут	121	16	17	9	9	76

Вид кривых ММР коллагена в растворе после гидролиза тромбином в течение трех суток для всех выбранных концентраций в сравнении с исходным нативным образцом представлены на рисунке 31.

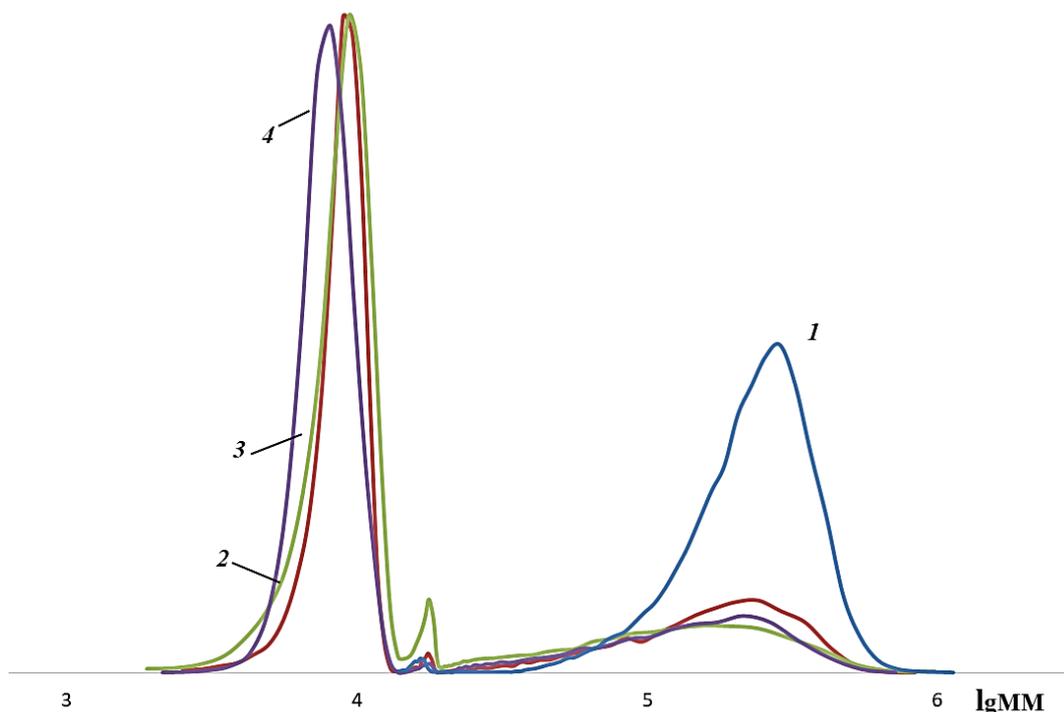


Рис. 31. Кривые ММР образца исходного коллагена (1), коллагена после 3-х суток гидролиза тромбином при массовом соотношении коллаген : тромбин 10:1 (2), 10^2 :1 (3), 10^3 :1 (4)

Таким образом, можно сделать вывод, что концентрация фермента практически не влияет на конечное разрушение белка. После трех суток гидролиза исходный высокомолекулярный коллаген трески разрушается до низкомолекулярного со значениями $M_w \sim 10^4$. При этом в образцах, подвергшихся гидролизу тромбином, присутствует также высокомолекулярная фракция с $M_w \sim 10^5$.

3.2.2. Ферментативный гидролиз привитых сополимеров [253, 302, 322]

Исследования ферментативного катализа гидролиза выполнены для образцов коллаген–ПММА и ТКС-3, представляющие собой однородные белые растворы полимерных продуктов. Результаты гидролиза сополимера коллаген–ПММА представлены в виде изменения молекулярно-массовых характеристик и долей различных фракций в течении 3-х суток (рис. 32).

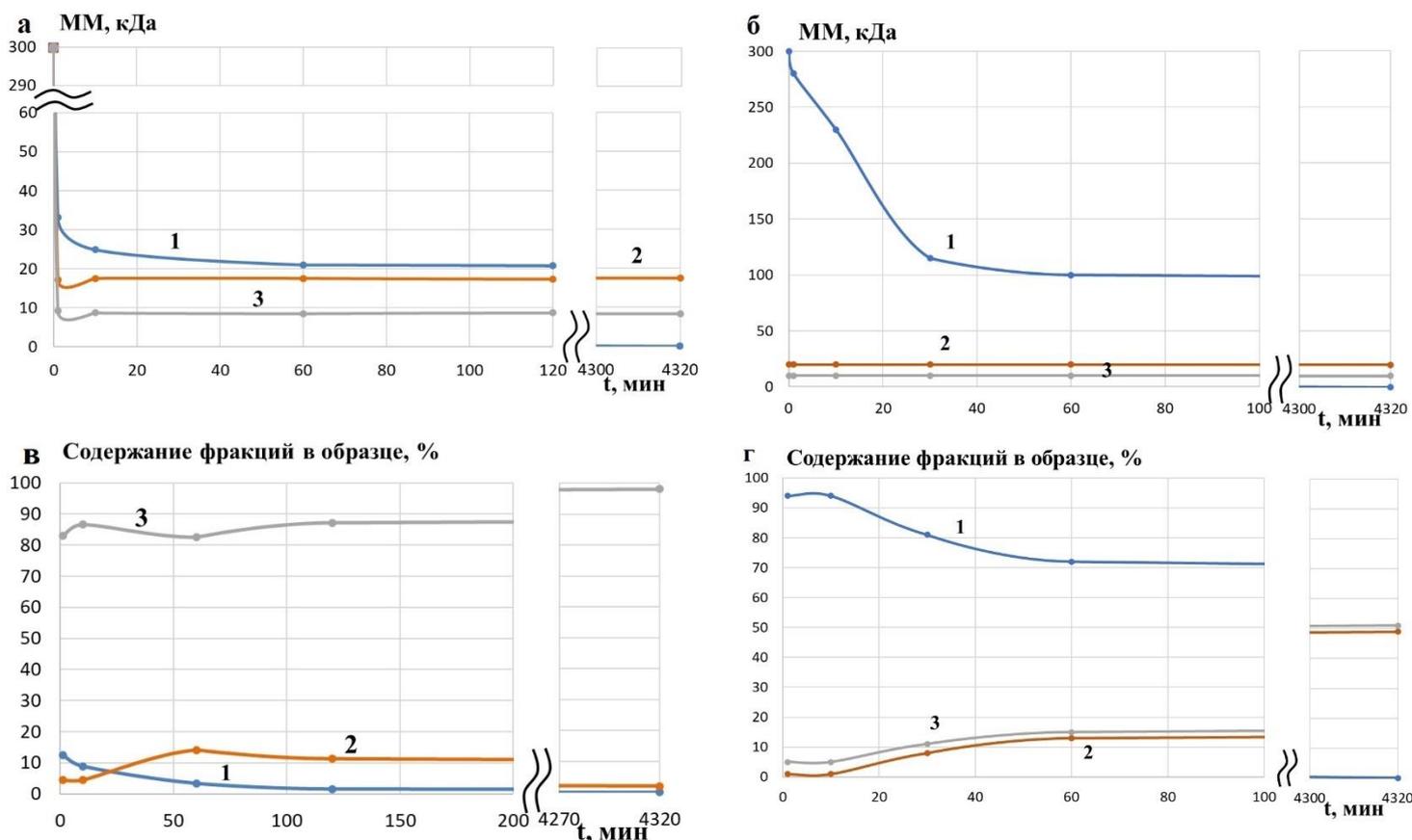


Рис. 32. Изменение молекулярно-массовых характеристик разных фракций при гидролизе раствора коллагена (а,в) и сополимера коллаген–ПММА (б,г) панкреатином в течение 3-х суток: 1 – Фракция с ММ выше 20 кДа; 2 – Фракция с ММ ~20 кДа; 3 – Фракция с ММ~10 кДа

Полученные данные позволяют заключить, что привитые к макромолекуле коллагена синтетические фрагменты не препятствуют гидролизу пептидных макромолекул, но изменяют скорость деструкции полимеров - разрушение происходит значительно медленнее (рис. 32). В отличие от коллагена, который распадается очень быстро и преимущественно до пептидов с ММ ~ 10 кДа (рис. 32, а, в), в случае привитого сополимера гидролиз проходит значительно медленнее, а соотношение фракций с ММ ~ 10 кДа и 20 кДа различается значительно меньше и их изменения проходят симбатно (рис. 32, б, г), а содержание полимера с ММ более 20 кДа через час после начала процесса составляет $\sim 70\%$ процентов. Контроль за процессом ферментативного гидролиза в течение 3 суток свидетельствует о постепенном снижении содержания полимера с ММ более 20 кДа практически до нулевых значений, и уменьшении ММ до 20 кДа и 10 кДа.

Результаты гидролиза сополимера ТКС-3 (фермент-субстратное соотношение коллаген:фермент = 10:1) представлены в виде изменения молекулярно-массовых характеристик (рис. 33).

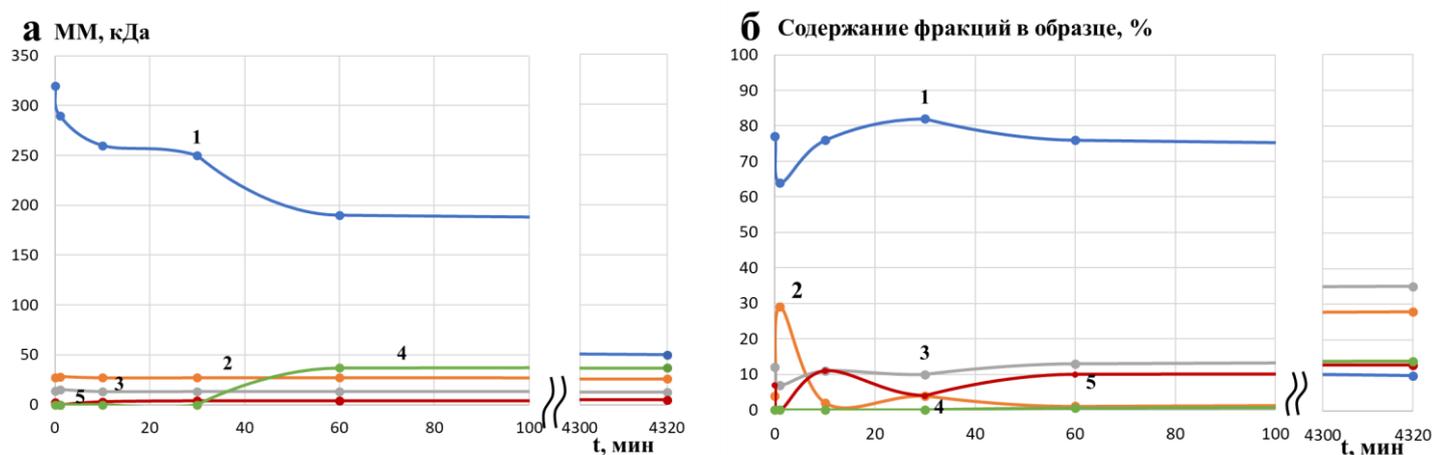


Рис. 33. Изменение молекулярно-массовых характеристик разных фракций (а) и содержание этих фракций в образце (б) при гидролизе привитого сополимера ТКС-3 панкреатином в течение 3-х суток: 1 – Фракция с ММ выше 20 кДа; 2 – Фракция с ММ ~ 20 кДа; 3 – Фракция с ММ ~ 10 кДа; 4 – Фракция с ММ ~ 40 кДа; 5 – Фракция с ММ меньше 10 кДа

При сравнении данных гидролиза сополимера коллаген–ПММА (см. рис. 32, б, г) и ТКС-3 (рис. 33) можно сделать вывод, что введение в состав привитого сополимера дополнительных модифицирующих добавок (ТГМ-3, ПЭГ, АК) приводит к еще большему замедлению скорости деструкции полимера под действием фермента в результате образованию стерических препятствий, мешающих ферменту подойти к связям, которые данная протеаза гидролизует. Наблюдается еще более медленное изменение ММ высокомолекулярной фракции и после 3-х суток гидролиза ее содержание остается около 10% с уменьшением ММ (с 300 кДа до ~50 кДа). Также после 60 минут гидролиза появляется фракция с ММ~40 кДа, которая сохраняется и после 3-х суток наблюдения. При этом на фракции с ММ ~20 кДа и 10 кДа приходится 30 и 40%, соответственно, от общего содержания всех фракций в образце, что меньше, чем в случае разрушения КС и сополимера коллаген–ПММА.

Очевидно, что при модификации исходного привитого сополимера коллагена путем введения модифицирующих добавок удастся варьировать время ферментативного гидролиза материала.

3.3. Рыбный желатин как альтернатива рыбного коллагена в гибридных материалах для регенеративной медицины

Результаты исследований трескового коллагена в материалах для регенеративной медицины имеют значительный потенциал для практических разработок новых материалов. Однако, известно, что коллаген – это термически нестабильный полимер: при температурах выше 30-40⁰С начинается его денатурация с образованием желатина [66-68, 324-326]. Различие коллагена и желатина состоит в том, что молекула коллагена представляет собой левозакрученную спираль из трёх α -цепей из аминокислотных остатков известных аминокислот вокруг общей оси. В водных растворах такая макромолекула стабилизируется дополнительно за счет водородных связей с водой. Молекула желатина – это денатурированная

спираль с нарушенными связями отдельных α -цепей и в водных растворах образует агрегаты между межмолекулярными свободными частями α -цепей в растворе. Благодаря этому полипептидные цепи желатина в разбавленных водных растворах образуют компактные частично проницаемые для растворителя клубки [69, 133, 327, 328]. Это всегда следует учитывать при проведении разработок.

Сравнительные данные о свойствах гибридных материалов на основе коллагена и желатина чаще всего получены с использованием белков животного происхождения [64-70]. Учитывая потенциальную перспективность ТК, необходимо было получить данные о химических свойствах ТЖ при ферментативном катализе его гидролиза и функциональных свойствах привитого сополимера с ПММА в фотокаталитическом синтезе. Такие исследования позволят оценить риски использования ТК в связи с его денатурацией при температурах выше 30-40⁰С и возможность замены ТК на ТЖ в гибридных композициях.

3.3.1. Сравнение характеристик трескового коллагена и желатина [329]

Выделенный продукт ТЖ был охарактеризован по молекулярно-массовым характеристикам, зольности и динамической вязкости (табл. 11). В табл. 11 представлены эти характеристики в сравнении с ТК. Как и следовало ожидать, ТК и ТЖ имеют сильно различающиеся значения динамической вязкости и близкие молекулярно-массовые параметры. Немного большие значения ММ в случае желатина могут быть связаны с уже отмеченной ранее агрегацией макромолекул [69, 133, 327, 328].

Таблица 11. Данные о молекулярной массе, зольности и вязкости трескового желатина в сравнении с тресковым коллагеном

Образец	Зольность (в сухом остатке), %	Динамическая вязкость, мПа*с	M _n , кДа	M _w /M _n
Желатин	2,0	25-35	300-350	1,2
Коллаген	1,3	4	260-300	1,2

Данные о ферментативном гидролизе желатина получены на примере катализа тромбином в нейтральной среде в течении 3-х суток. Изменения ММ и доли фракций в растворе белков ТЖ и ТК в сравнении представлены на рис. 34 и 35, соответственно.

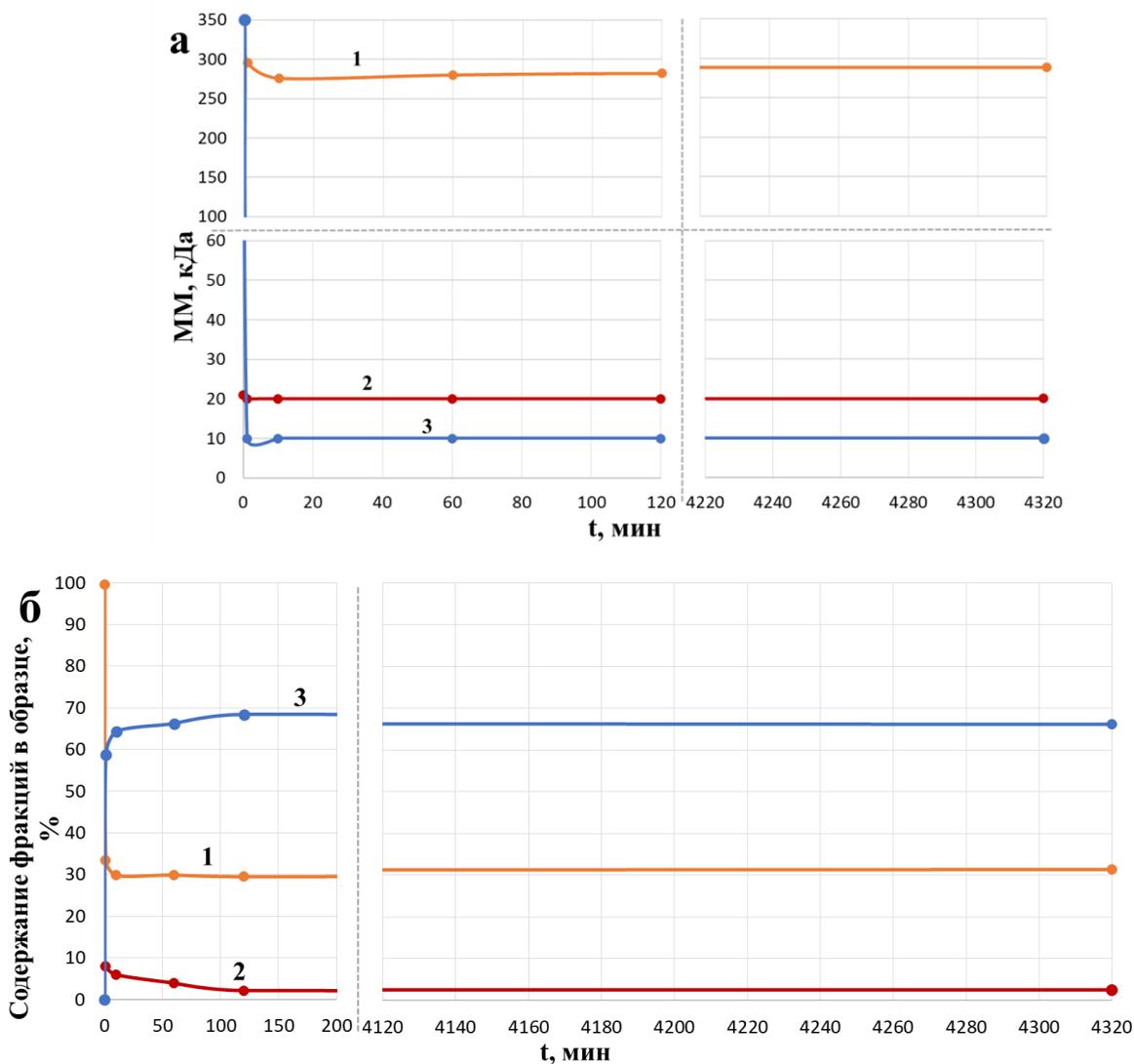


Рис. 34. Изменение молекулярно-массовых характеристик разных фракций (а) и содержание этих фракций в образце (б) при гидролизе ТЖ тромбином в течение 3-х суток: 1 – Фракция с ММ выше 20 кДа; 2 – Фракция с ММ ~20 кДа; 3 – Фракция с ММ ~10 кДа

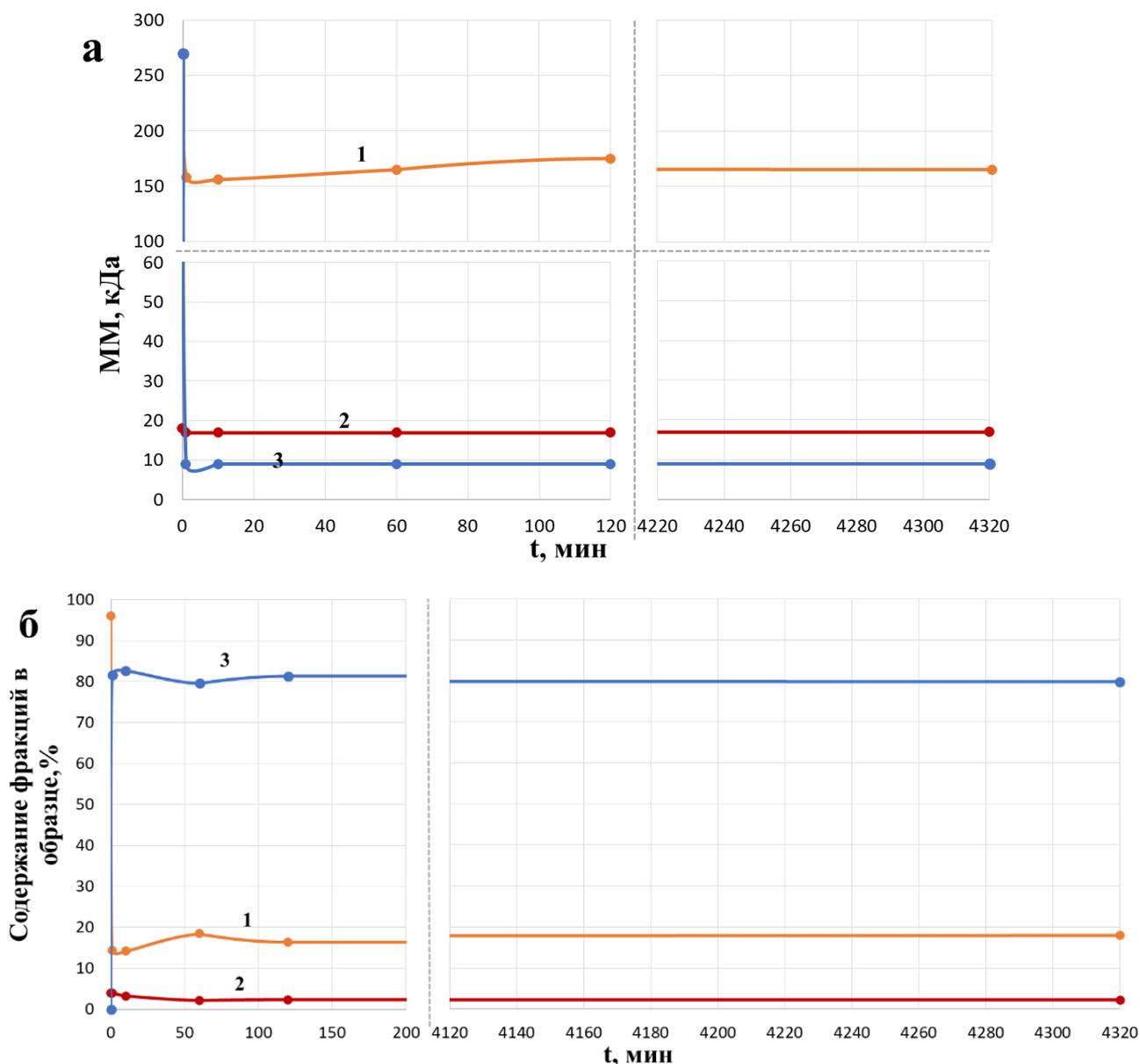


Рис. 35. Изменение молекулярно-массовых характеристик разных фракций (а) и содержание этих фракций в образце (б) при гидролизе ТК тромбином в течение 3-х суток: 1 – Фракция с ММ выше 20 кДа; 2 – Фракция с ММ ~20 кДа; 3 – Фракция с ММ ~10 кДа

Как и в случае ТК, макромолекулы с ММ ~ 300 кДа подвергаются гидролизу в значительной степени за первую минуту до пептидов с ММ ~ 20 кДа и преимущественно с ММ ~ 10 кДа. В отличие от ТК, где соотношение этих фракций практически не изменяется в период наблюдения, в случае ТЖ происходит нарастание содержания фракции с ММ~ 10 кДа. Другим отличием процесса гидролиза ТЖ от ТК является сохранение исходной

высокомолекулярной фракции в течении всего процесса, и её доля в интервале с первой минуты гидролиза и до трёх суток практически не изменяется и составляет ~ 30%.

3.3.2. Синтез привитого сополимера желатин-ПММА в присутствии сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ [329, 330]

Синтез привитого сополимера желатин-ПММА при фотокатализе в присутствии сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ проводили в условиях, аналогичных таковому с ТК. В водной фазе после синтеза был обнаружен полимер, масса которого увеличилась в сравнении с исходным ТЖ на 10-15%, при этом выросла ММ в сравнении с исходным образцом: на 12-13%, а коэффициент полидисперсности не изменил своего значения (1,2). Кроме того, содержание азота в привитом сополимере желатин-ПММА после синтеза заметно уменьшилось в сравнении с исходным образцом желатина. На рис. 36 приведены данные указанных характеристик в сравнении с привитым полимером коллаген-ПММА (рис. 36).

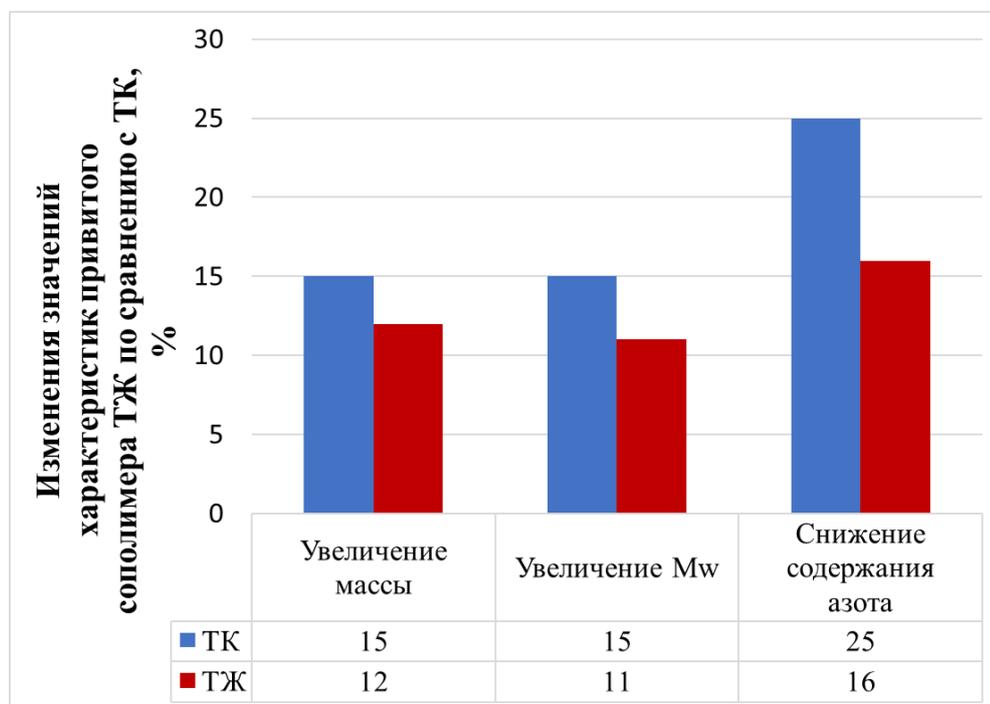


Рис. 36. Сравнительные данные характеристик привитых сополимеров на основе ТК и ТЖ

Визуализированная морфология лиофильно высушенной губки образца водной фазы эмульсии привитого сополимера желатин-ПММА представлена в сравнении с таковой для привитого сополимера коллаген-ПММА на рис. 37.

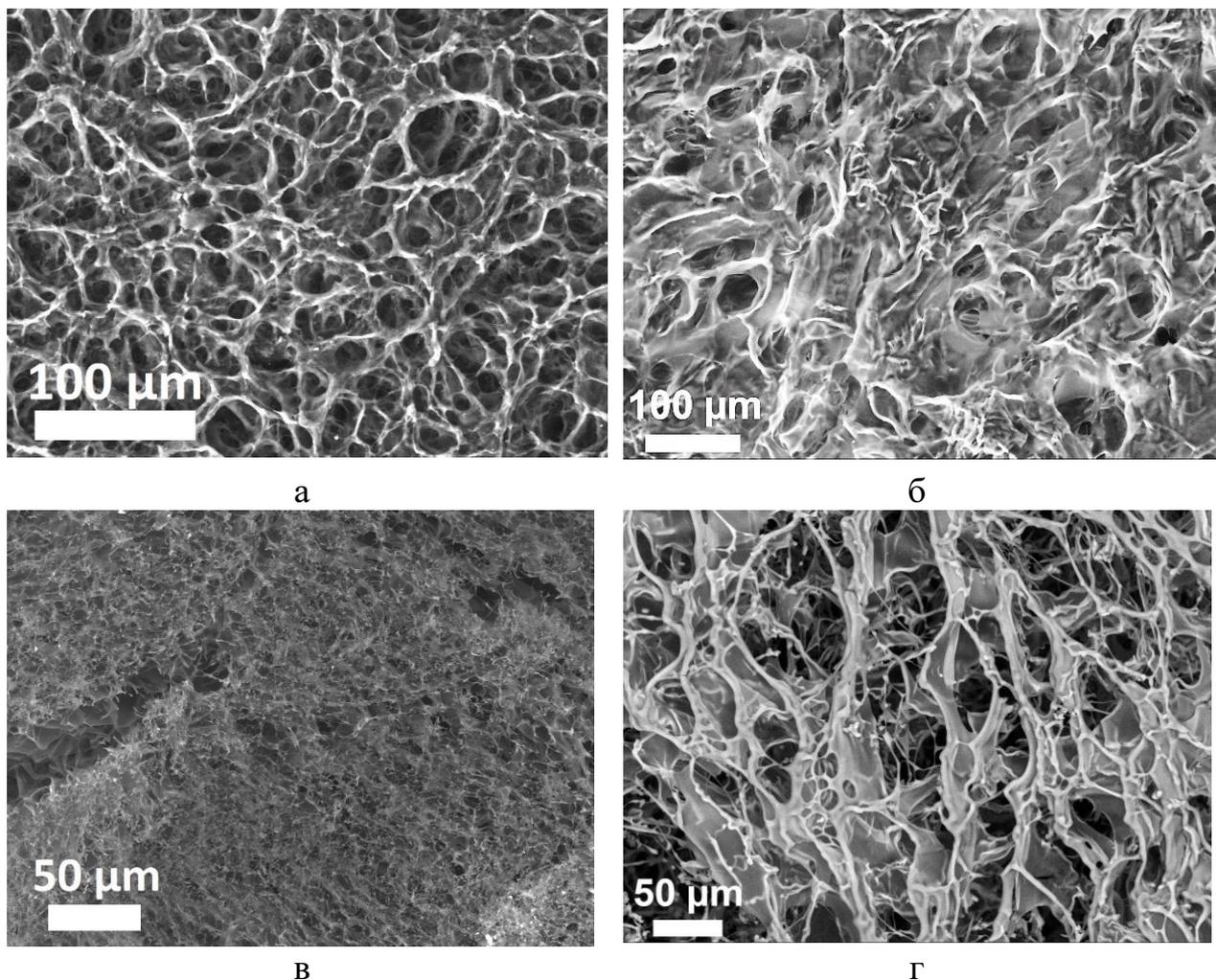


Рис. 37. Изображения СЭМ микроструктуры лиофильно высушенного сополимера желатин-ПММА (а) и коллаген-ПММА (б), исходного желатина (в) и коллагена (г)

При рассмотрении микроструктуры образца лиофильно высушенного привитого сополимера желатин-ПММА можно отметить наличие сложной морфологии с характерной, как и в случае ТК, системой взаимопроникающих пор.

3.4. Биосовместимость новых гидрогелей на основе трескового коллагена

Новые полимерные продукты – гидрогели на основе ТК представляют значительный интерес как раневые покрытия и скаффолды. Исследования биосовместимости представляют интерес в данной работе как реальное воплощение новых достижений в решении проблем макромолекулярного дизайна в полимерной химии и их практическая реализация в жизни. В то же время, специальная подготовка образцов и анализ некоторых характеристик гидрогелей сополимеров трескового коллагена, необходимых для проведения анализа биосовместимости, а также предварительные результаты МТТ-теста этих образцов представляют интерес именно в рамках данного исследования с целью оценки перспектив их реализации в регенеративной медицине. Кроме того, при анализе методом СЭМ в сополимере коллаген–ПММА и лиофильно высушенном образце гидрогеля на его основе обнаружены частицы оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$, размеры которых составляют ≤ 2 нм, которые способны выполнять роль грибостойкой добавки. В связи с этим были проведены биотесты грибостойкости как сополимеров коллаген–ПММА, так и гидрогелей на их основе.

3.4.1. Предварительные испытания гидрогелей на основе сополимера коллаген–ПММА [277]

Одним из ключевых свойств гидрогелей, обеспечивающих их уникальные свойства в качестве матриц-носителей клеток в регенеративной медицине, является их способность удерживать большое количество воды [86]. Это позволяет обеспечить поддержание условий среды, способствующей клеточному росту, дифференциации и регенерации тканей. Не менее важна способность «сухих» матриц в водной фазе активно поглощать воду и сохранять структурную устойчивость образовавшегося геля. Такое свойство способно обеспечить впитывание экссудата в ране при использовании матрицы в качестве раневого покрытия. Последнее помогает

поддерживать оптимальное содержание влаги в ложе раны и защитить окружающую кожу от мацерации [331, 332]. Пористая структура гидрогелей позволяет имитировать структуру нативной тканевой среды, облегчая обмен питательных веществ и формирование клеточных связей, критически важных процессов для регенерации тканей [261, 262]. Кроме того, возможность миграции клеток и васкуляризации связана с размером и наличием взаимопроникающих пор. Не менее важна и структурная устойчивость гидрогеля при определенных значениях рН. Так, для культивирования большинства типов клеток оптимальным значением рН, позволяющим им поддерживать функциональную активность, является рН плазмы крови – 7,2-7,4 [259, 260]. В то же время в раневом ложе значения рН могут значительно варьировать [333, 334], последнее может негативно сказываться на регенеративном процессе, поддерживать рост бактериальной микрофлоры и оказывать влияние на поведение гидрогеля в ране, например, вызывать его преждевременную деградацию. В ряде исследований показано, что рН играет роль в опосредованной скорости заживления ран [335, 336]. Таким образом, сбалансированный по рН гидрогель, обладающий устойчивостью к изменению рН окружающей среды, должен способствовать оптимизации микросреды раневого ложе и поддержанию регенеративных процессов. Также следует отметить, что при использовании матриц на основе гидрогелей в качестве систем доставки лекарств в ряде исследований показано значительное влияние рН на эффективность транспорта лекарственных средств [337-340].

В данном разделе представлены результаты анализа гидрогелей на основе сополимера коллаген–ПММА по характеристикам, необходимым для проведения МТТ-теста.

Результаты испытаний на структурную устойчивость образца гидрогеля ТКС-3 по методике [244] (табл. 12, строка 1,2) показали, что в течение 30 минут центрифугирования все образцы подвергались частичному разрушению.

Таблица 12. Результаты испытаний гидрогелей на структурную устойчивость

№ п/п	Образец гидрогеля	Время испытания, мин.	pH буферного раствора	Разрушение во время испытания
1	ТКС-3	30	6.8	да
2			7.2	да
3	ТКС-С		6.8	да
4			7.2	да
5	ТКС-Г		6.8	нет
6			7.2	нет

С целью усовершенствования методики получения гидрогелей для повышения их структурной устойчивости использовали два известных подхода. Одним из них является выдерживание гидрогеля в растворе этанола. Как известно, действие этанола на белки обусловлено изменением межмолекулярных взаимодействий молекул белка [341]. Спирты обладают водоотнимающими свойствами. Молекулы спирта изменяют белковые структуры главным образом путем дегидратации, вызывают перераспределение гидратационного слоя и, взаимодействуя с белками, способствуют сохранению структуры гидрогеля [342]. В результате обработки ТКС спиртом были получены образцы (ТКС-С).

Второй подход — использование глутарового альдегида, который вступает в реакцию с белками [298-300], такими как коллаген (ТКС-Г). Механизм сшивки ГА молекул коллагена рассматривался в разделе 3.1.3.

Результаты испытаний образцов ТКС-С и ТКС-Г на структурную устойчивость показали, что в течение 30 мин центрифугирования образцы ТКС-С (см. табл. 12, строки 3, 4) подвергались частичному разрушению: небольшие фрагменты геля отделялись от основного образца. В то же время образцы ТКС-Г выдерживали испытания при указанных значениях pH (см. табл. 12, строки 5, 6, рис. 38)

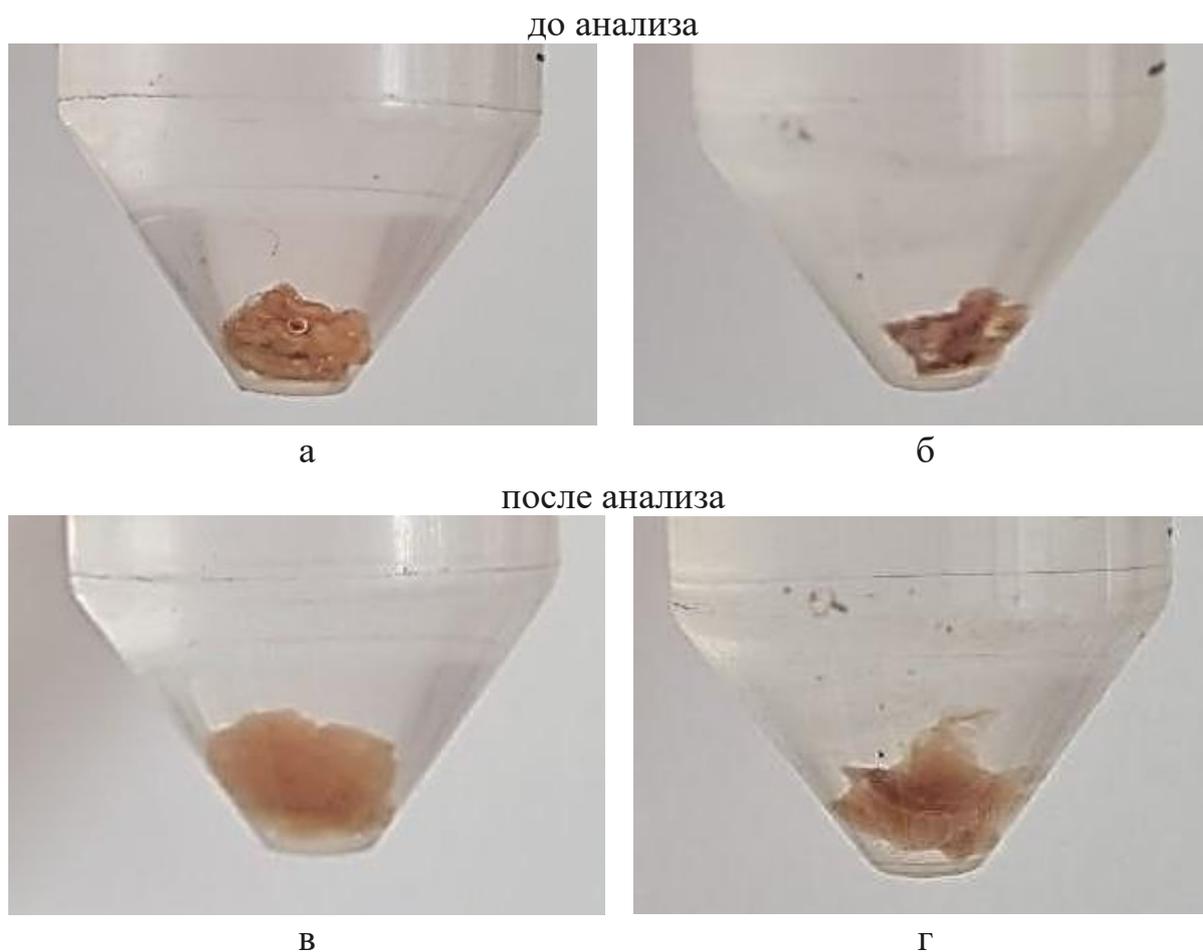


Рис. 38. Фотографии образца ТКС-Г до и после анализа устойчивости в водных слабокислых и нейтральных растворах: рН 6.8 (а, в), рН 7.3 (б, г)

Ранее уже отмечалось, что образцы ТКС-Г легко впитывают воду. По методике работы [343] было установлено, что влагопоглощение образцов происходит во времени (рис. 39). За первую минуту образцы поглощают воду в 2 раза больше, чем собственная масса. После 45-60 минут скорость влагопоглощения резко падает, медленно достигая за трое суток массы, превосходящей исходную массу ТКС-Г практически в девять раз. Поглощение воды, в несколько раз превышающее массу исходного сухого гидрогеля, является хорошим показателем. Так в работе [344] отмечается, что идеальным диапазоном влагопоглощения для гидрогелей является 100–900%. Кроме того, в качестве примера можно привести близкие значения влагопоглощения для образцов скаффолдов на основе рыбного коллагена, полилактида и хитоолигосахаридов: более 250% в течение 30 мин [345].

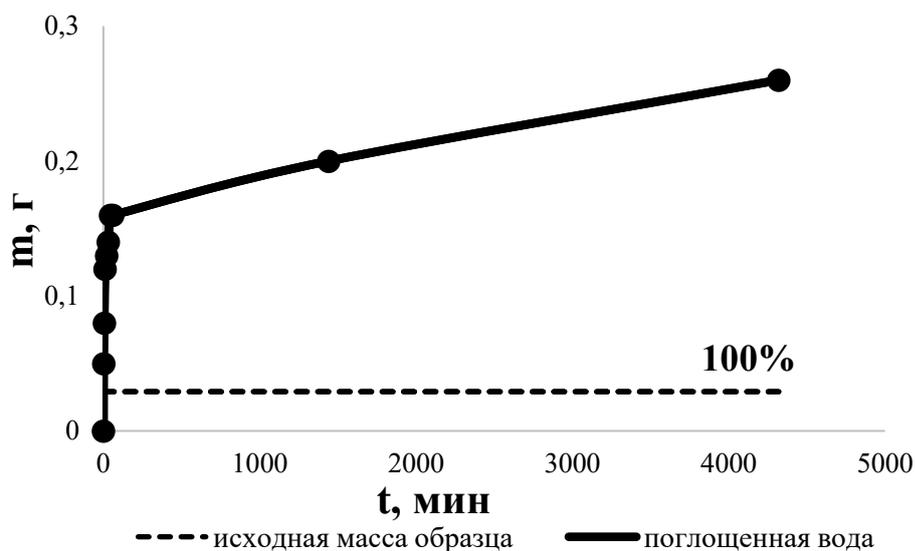


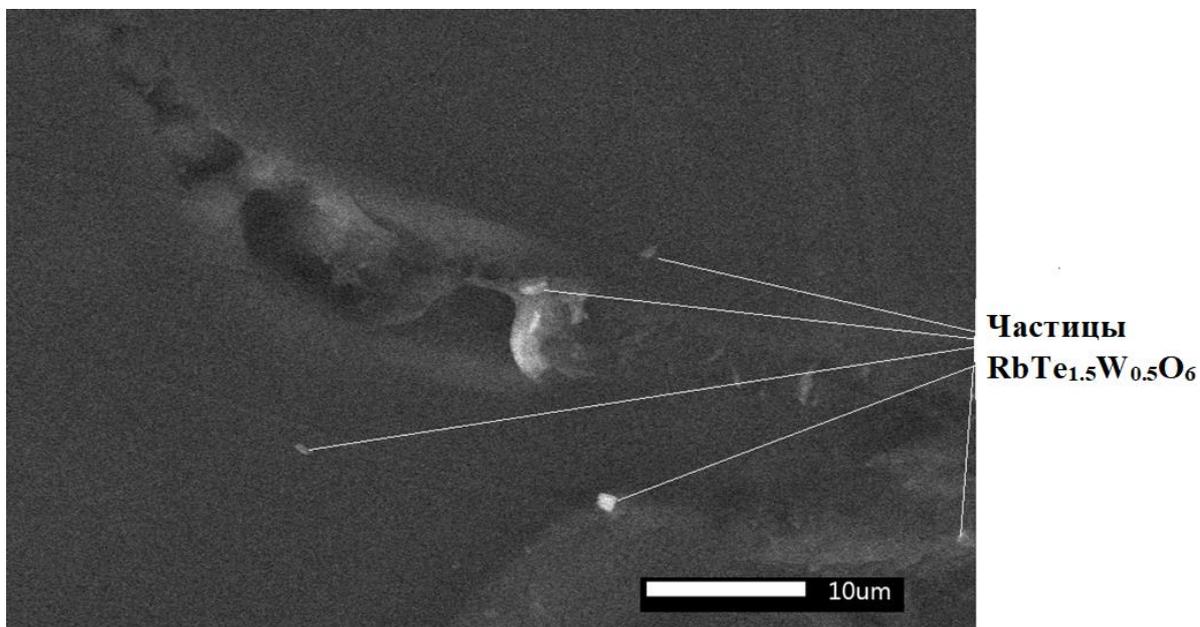
Рис. 39. Кривая влагопоглощения образца ТКС-Г

Полученные результаты позволяют рассматривать представленные гидрогели в качестве перспективных материалов для регенеративной медицины и создают предпосылки для проведения необходимых доклинических исследований цитотоксичности и биосовместимости *in vitro*.

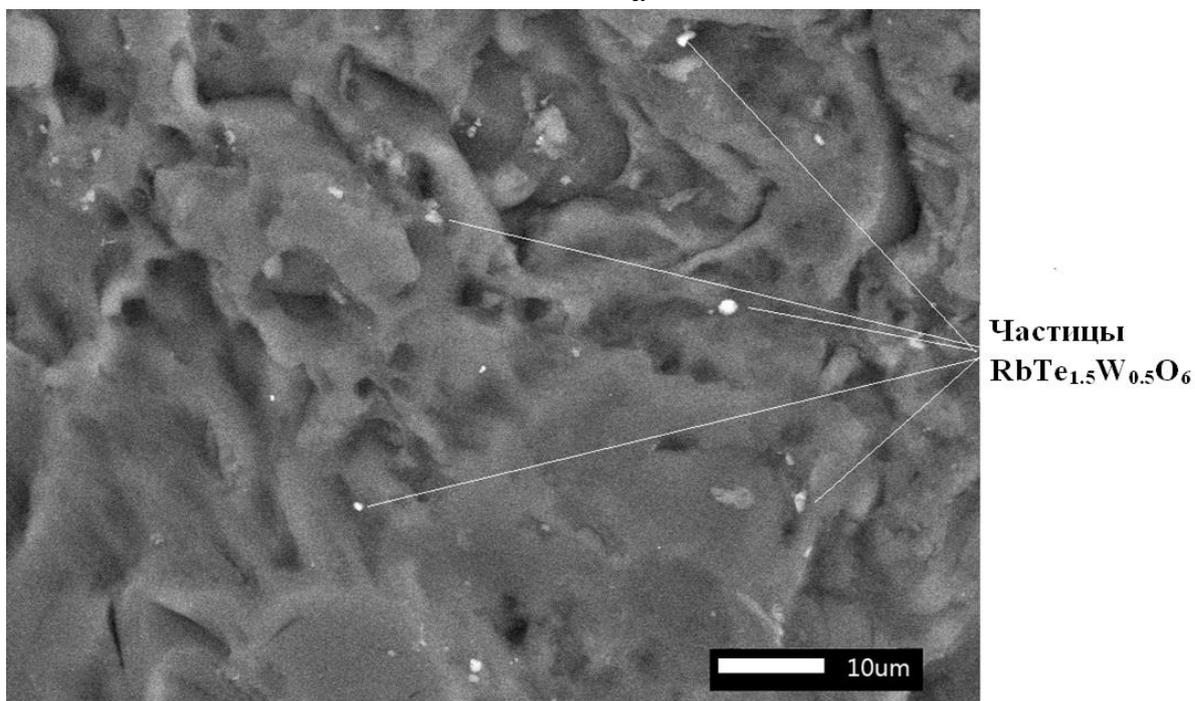
3.4.2. Влияние наночастиц катализатора на грибостойкость полимерных материалов на основе сополимера коллаген-ПММА [346]

Хорошо известно, что полимерные материалы на основе природных полимеров в условиях эксплуатации легко повреждаются биологическими агентами, основными среди которых являются микроскопические грибы. Для предотвращения поражения материала чаще всего вводятся специальные добавки. Основной задачей таких добавок является подавление роста плесневых грибов и предотвращение разрушения пластиков, т.е. добавки придают пластикам способность поддерживать стерильность поверхности в течение длительного времени и предотвращают процесс биоповреждений. В настоящее время получили значительное распространение неорганические добавки – соединения металлов, чаще всего оксиды серебра, цинка в микро- и даже наноконцентрациях, которые специально вводят в материал в процессе изготовления или в готовое изделие как покрытие [347].

Исследования сополимера коллаген–ПММА и материалов ТКС-3, ТКС-Г методом СЭМ при большом увеличении с использованием РМА позволили обнаружить в образцах наночастицы катализатора $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ размером ≤ 2 нм (рис. 40 на примере сополимера коллаген–ПММА).



а



б

Рис. 40. Изображения СЭМ высушенных пленок сополимера коллаген–ПММА

Пленки полимерных материалов коллаген–ПММА, ТКС-3, ТКС-Г испытывали на грибостойкость по ГОСТу [246]. Результаты анализа показали, что все образцы грибостойки (0 баллов, см. табл. 2), т.е. частицы сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ размером ≤ 2 нм выполняют функции противогрибковой добавки. Грибостойкость медицинских полимерных композитов является критическим свойством таких материалов, поскольку оно определяет долгосрочную функцию конкретного биомедицинского изделия.

3.4.3. Оценка цитотоксичности образцов на основе сополимера коллаген–ПММА с помощью МТТ-теста [348]

Оценка цитотоксичности проведена по методике МТТ-теста в соответствии с рекомендациями ГОСТ Р ИСО 10993-5:2009. Анализ проводили для высушенного образца сополимера ТКС-Г, представляющего интерес для создания раневых покрытий. Также важно было определить для сравнения цитотоксичность и для промежуточного продукта – гидрогеля ТКС-3. Часть образца ТКС-3 дополнительно экстрагировали хлороформом и вновь высушивали до постоянного веса – (ТКС-Х). Предполагалось, что, если в образце ТКС-3 могут оставаться не прореагировавшие исходные органические соединения, после экстракции хлороформом токсичность может измениться. Наряду с гидрогелями исследовали продукт ферментативного разрушения образца ТКС-3 – ТКС-Ф: хорошо известно, что протеолитические ферменты, содержащиеся в тканях любого живого организма [349], разрушают коллаген и коллагенсодержащие материалы [350-352]. Этим вызвана необходимость испытания образца ТКС-Ф.

Результаты исследований цитотоксичности образца ТКС-3 показали, что суточный экстракт и его разведение 1:1 проявляли выраженную цитотоксичность – 4 ранг (рис. 41). При дальнейшем разведении экстракта цитотоксический эффект нивелировался, а результаты МТТ-теста для

разведений 1:4 и 1:8 соответствовали 1-0 рангу. Микроскопическая картина разведений 1:4 и 1:8 практически не отличалась от контроля.

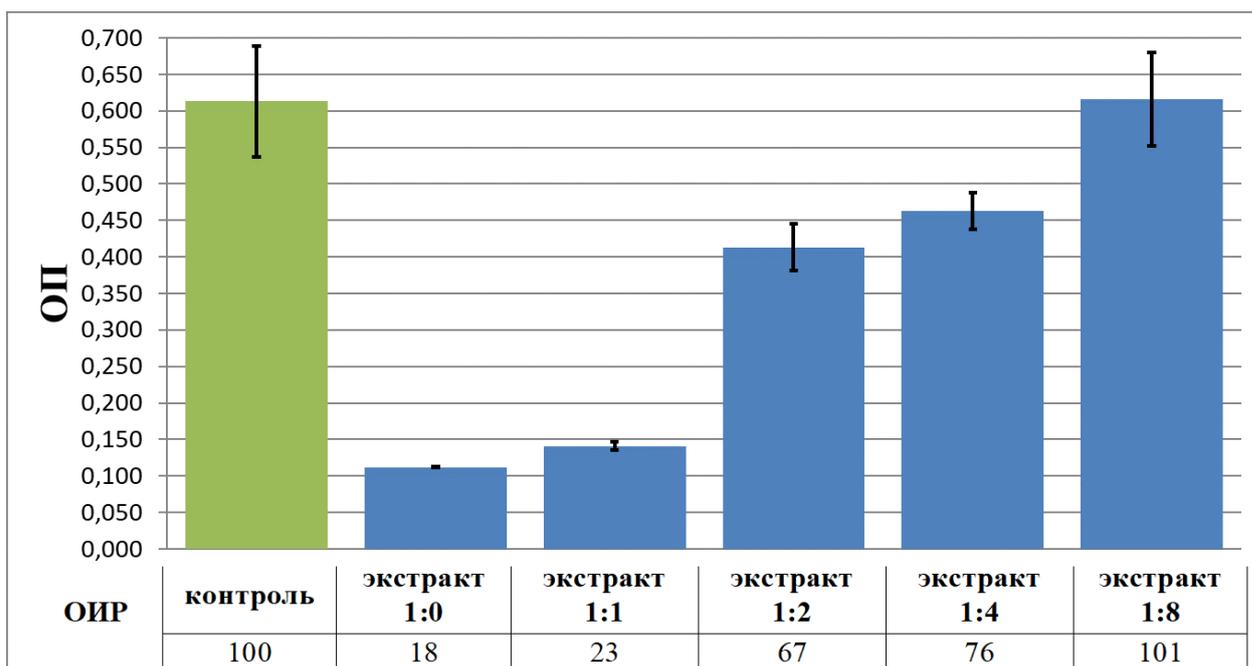


Рис. 41. Оптическая плотность при исследовании экстракта образца ТКС-3 и его разведений и значения относительной активности роста

Результаты МТТ-теста экстракта образца ТКС-Х также показали токсичность, который соответствовал 4 рангу цитотоксичности. Разведения экстракта 1:2-1:8 демонстрировали отсутствие цитотоксичности – ранг 1-0. Микроскопическая картина данных разведений экстракта представляла собой конфлюэнтный клеточный монослой, визуально не отличающийся от контроля (рис. 42).

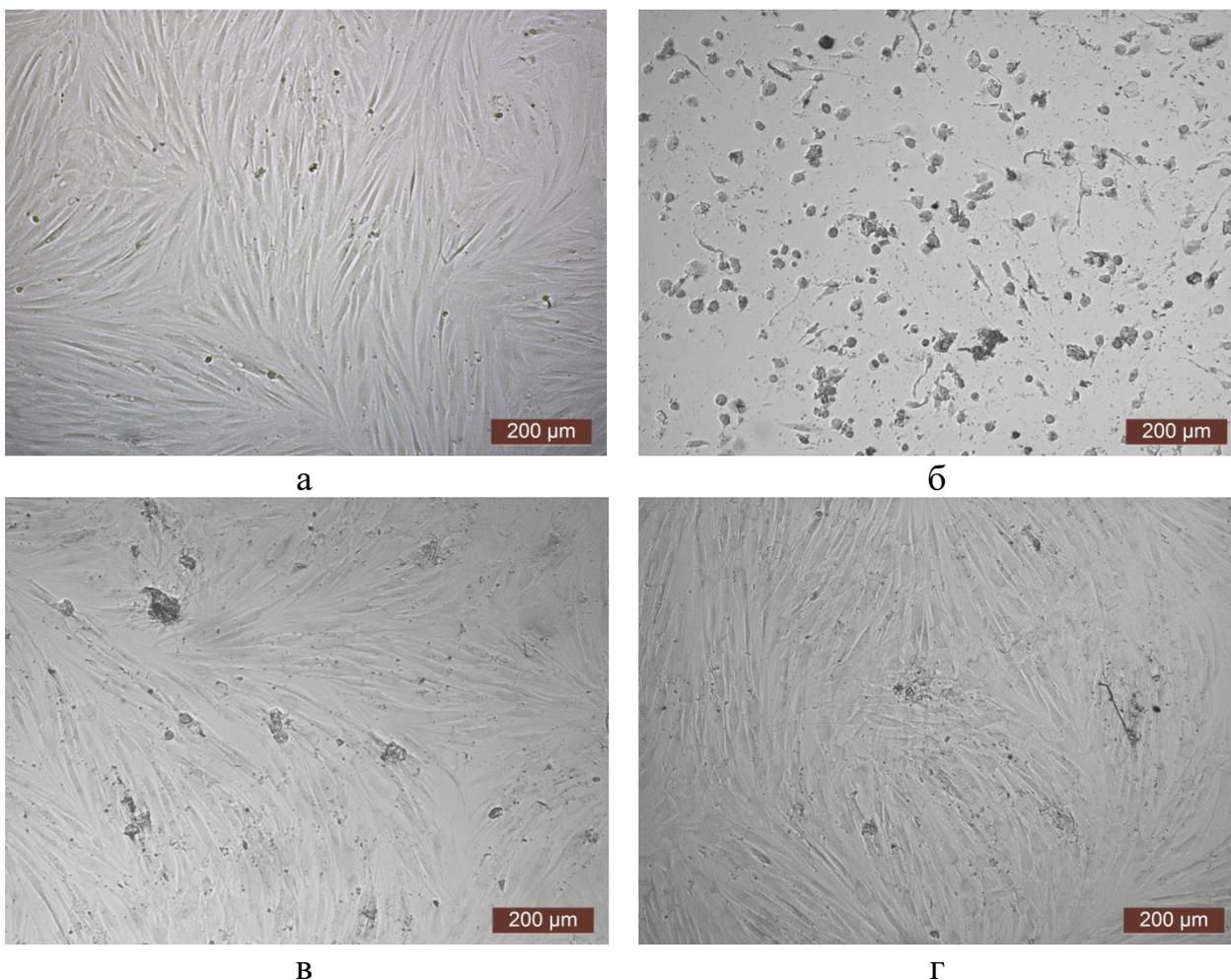


Рис. 42. Репрезентативные фотографии состояния культуры клеток после культивирования с экстрактом образца ТКС-Х (24 часа культивирования, увеличение 100х): контроль (а), экстракт 1:0 (б), экстракт 1:1 (в), экстракт 1:2 г)

Следует отметить, что при сильном разведении экстракта (1:4 и 1:8), ОП превышала значения контроля, соответственно ОИР также был выше 100% (129% для разведения экстракта 1:4; 127% для разведения экстракта 1:8). Это свидетельствовало об усилении пролиферативной активности клеток, а, следовательно, о некотором стимулирующем эффекте веществ, входящих в состав экстракта, в низких концентрациях.

Таким образом, при сравнении образцов ТКС-3 и ТКС-Х по результатам МТТ-теста мы наблюдаем близкие значения показателей, что свидетельствует об отсутствии токсичных включений в гидрогель уже после лиофильной сушки, т.е. стадия экстракции органических токсичных

фрагментов хлороформом может быть исключена из «цепочки» подготовки гидрогеля для испытаний биосовместимости.

Данные результатов исследования цитотоксичности образца ТКС-Г продемонстрировали, что суточный экстракт проявлял токсичность – 4 ранг. При дальнейшем разведении экстракта цитотоксический эффект нивелировался, а результаты МТТ-теста для разведений 1:2-1:8 соответствовали 1 рангу (отсутствию цитотоксичности). Микроскопическая картина при исследовании разведений экстракта 1:2-1:8 практически не отличалась от контроля: клеточная культура формировала конфлюэнтный монослой, сформированный типичными фибробластами удлиненной веретенообразной формы, с выраженными отростками (рис. 43).

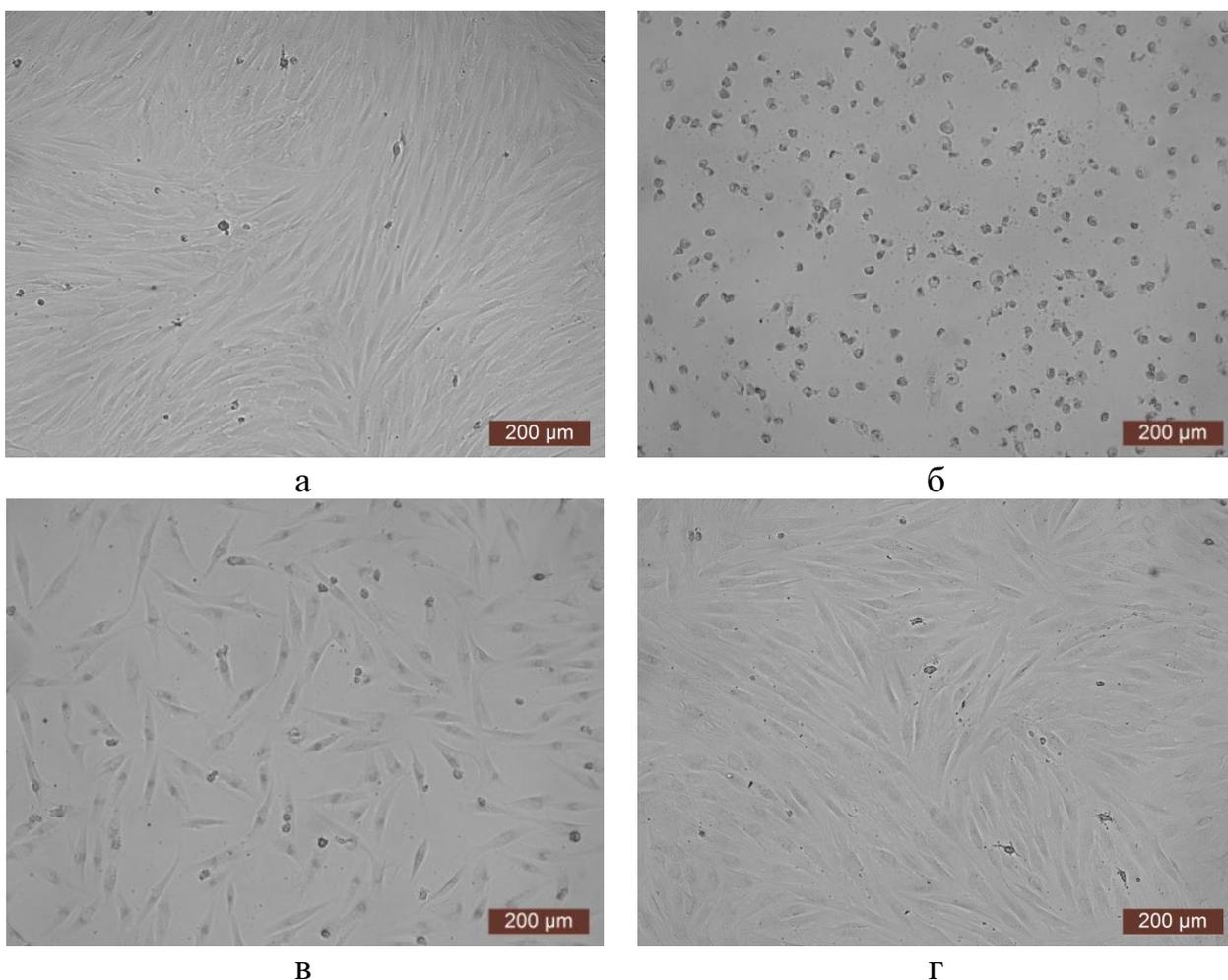


Рис. 43. Репрезентативные фотографии состояния культуры клеток после культивирования с экстрактом образца ТКС-Г (24 часа культивирования, увеличение 100x): контроль (а), экстракт 1:0 (б), экстракт 1:1 (в), экстракт 1:2 г)

Экстракт образца ТКС-Ф и его разведения, в отличие от предыдущих образцов, не проявляли цитотоксичности. Так, колориметрический анализ показал, что ОП и экстракта, и его разведений 1:1-1:8 соответствовали 1-0 рангу цитотоксичности. При проведении микроскопического исследования культура ДФЧ под действием экстракта в разведениях 1:1-1:8 представляла собой конфлюэнтный монослой, сформированный веретеновидными клетками, плотно прилегающими друг к другу, который соответствовал таковому в контроле (рис. 44).

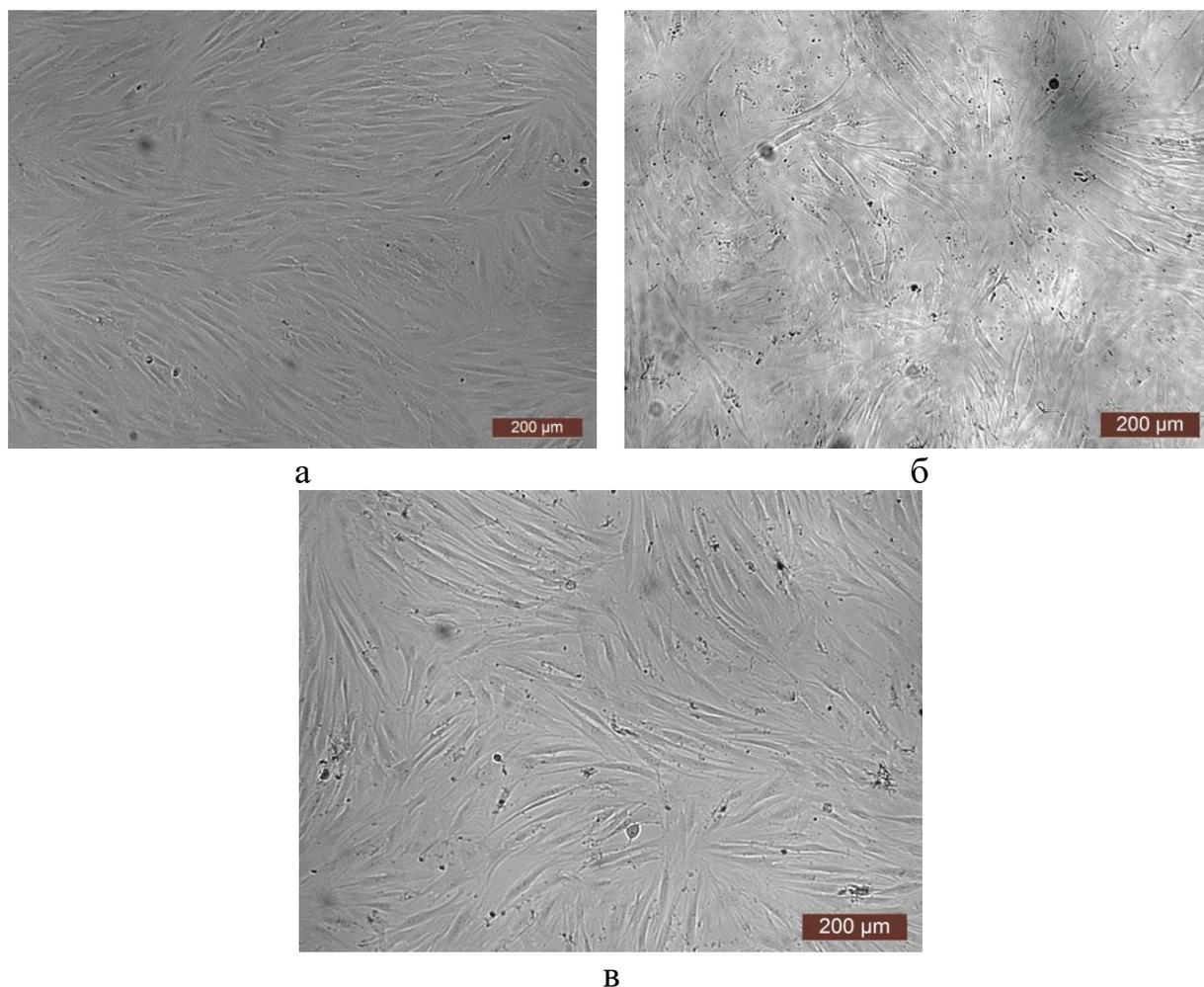


Рис. 44. Репрезентативные фотографии состояния культуры клеток после культивирования с экстрактом образца ТКС-Ф (24 часа культивирования, увеличение 100х): контроль (а), экстракт 1:0 (б), экстракт 1:1 (в)

В результате исследования цитотоксичности новых гидрогелей на основе сополимера коллаген–ПММА с использованием МТТ-теста было показано, что цитотоксичность экстрактов образцов если и наблюдается в

ряде примеров, то нивелируется при увеличении разведений экстрактов. Кроме того, снижение жизнеспособности клеток при больших концентрациях экстракта может быть связано не с выделением цитотоксичных веществ из геля, а снижением количества специфических компонентов полной культуральной среды, используемой для получения экстрактов, за счет известной адсорбции белков среды компонентом геля, высокомолекулярными соединениями, входящими в состав матрицы: ТК, ПММА, ПЭГ. Этот факт хорошо известен и обсуждается в литературе [353-355]. Разведение экстракта приводило к стимулирующему эффекту веществ, входящих в его состав, т.е. усилению пролиферативной активности клеток. Данные МТТ-теста экстракта образца гидролизата гидрогеля и все его разведения не проявляли цитотоксичности. Последнее позволяет допустить, что разрушение гидрогеля в случае его использования на раневой поверхности, происходящее под действием ферментов, не приводит к выделению токсичных осколков гидрогеля.

3.4.4. Оценка эффективности и безопасности покрытия на основе сополимера коллаген-ПММА для заживления ожоговых ран на крысах [356]

Для испытаний эффективности и безопасности покрытий для быстрого заживления ран и ожоговых поверхностей были изготовлены образцы на основе гидрогелей ТКС-Г в виде пластин-губок размером 3*3 см. Такие пластины-губки в форме окружности представлены на рис. 45.



Рис. 45. Фотография гидрогеля ТКС-Г в виде пластины-губки

Крыс разделили на 3 равные по численности группы с использованием способа рандомизации: контроль 1 - ожог без лечения, контроль 2 – коммерческое покрытие (коллагеновая губка), опыт 1 – пластина-губка ТКС-Г. Оценку динамики заживления ожогового дефекта осуществляли планиметрическим методом.

Таблица 13. Динамика площади (S , см²) дефектов кожи крыс при регенерации термического ожога

	0 суток	7 суток	14 суток	21 сутки	28 сутки
Контроль 1 (без лечения)	22,52±0,71	21,55±0,28	12,62±0,15	4,34±0,11	2,76±0,03
Контроль 2 (коммерческое покрытие)	21,81±0,53	20,93±0,47	11,15±0,09	3,83±0,02*	1,31±0,02*
Опыт 1 (пластина- губка ТКС-Г)	22,30±0,72	20,04±0,67	10,43±0,38*	3,32±0,05 */Δ	0,68±0,01 */Δ

Примечание: * – различие статистически значимо ($p<0,05$) между показателем у животных группы опыт 1 и контроль 1; Δ – различие статистически значимо ($p<0,05$) между показателем у животных опыт 1 и контроль 2.

Планиметрическая оценка площади термических поражений кожи на 7 сутки эксперимента показала, что у животных опытной группы абсолютные значения этого параметра были достоверно ниже в сравнении с обеими

группами контроля (табл. 13). При этом скорость сокращения площади струпа на 7 сутки составила в опытной группе 10,1%, против 4,3% и 4,3% в группах контроль 1 и 2, соответственно. Регистрируемые более высокие темпы восстановительных процессов в опытной группе крыс на этой стадии регенерации с позиций морфологических изменений базируются на быстром купировании воспаления и отсутствии тенденции к распространению воспалительного инфильтрата в окружающие ткани. Всё это характеризует процесс очищения раневого поля как более качественный и интенсивный и приводит к смене стадии воспаления следующей – пролиферации с образованием грануляционной ткани в области нанесенной травмы.

На 28 сутки эксперимента зона ожога у крыс опытной группы была представлена соединительно-ткаными рубцами и местами напоминала неповрежденную кожу, начал восстанавливаться шерстный покров (рис. 46), что свидетельствует о практически полном завершении регенераторных процессов под влиянием исследуемого покрытия.

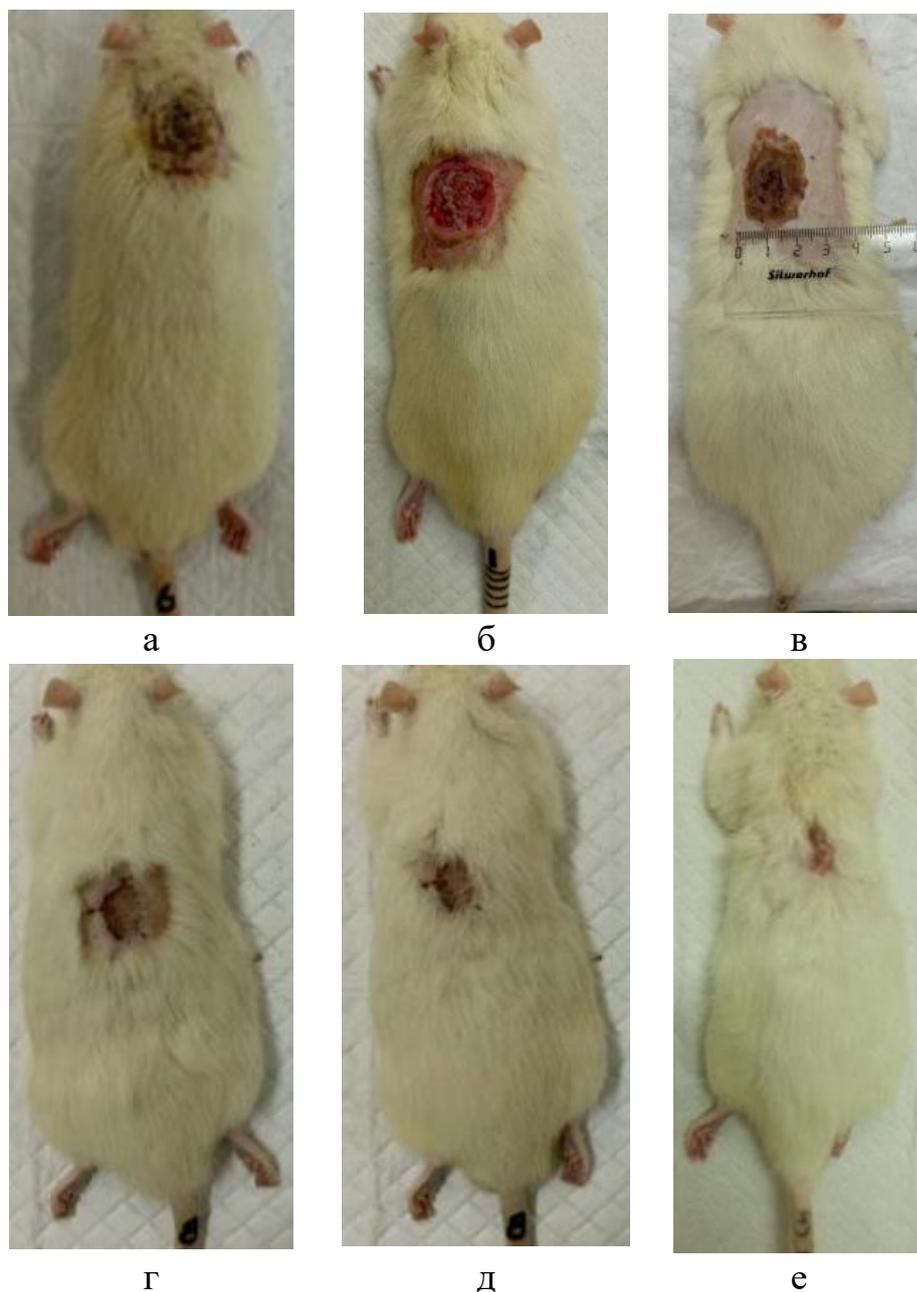


Рис. 46. Регенерация кожных покровов в группе опыт 1 (пластина-губка ТКС-Г): после ожога (0 сутки) (а), скальпированная рана (0 сутки) (б), 7 сутки после ожога (в), 14 сутки после ожога (г), 21 сутки после ожога (д), 28 сутки после ожога (е)

У крыс контрольных групп регенерация ожога была еще не завершена на 28-е сутки (рис. 47). Так, в группе контроль 1 на 28 сутки площадь остаточного ожогового дефекта еще имела значение $2,76 \pm 0,03 \text{ см}^2$, что составляло 12,3% от исходной в начале эксперимента (рис. 47, а), в группе контроль 2 – $1,31 \pm 0,02 \text{ см}^2$ или 6,0% от исходной (рис. 47, б).

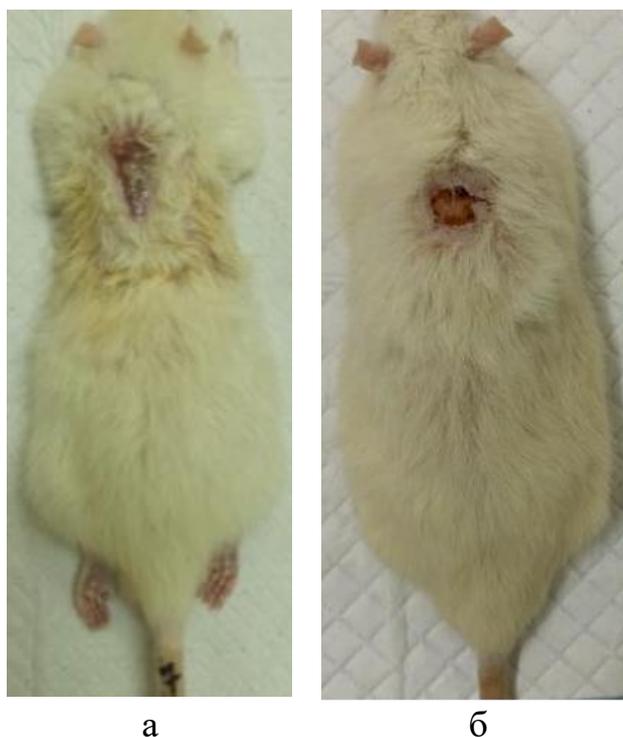


Рис. 47. Регенерация кожных покровов на 28 сутки после ожога: контроль 1 (ожог без лечения) (а) и контроль 2 (коммерческое покрытие) (б)

У крысы из группы опыт 1 гистологическая картина препарата среза лоскута кожи характеризуется смешанно-клеточным воспалением в дерме, у поверхности наблюдался крупный язвенный дефект с формированием «корки», в подлежащей рубцовой ткани очажки казеозного или «сухого» некроза. Признаков бактериальной инфекции или неоплазии не выявлено. Таким образом, выявленные изменения в тканях соответствуют регенераторным изменениям с эпителизацией и образованием рубцовой ткани.

После термической травмы на местном уровне выявлена отрицательная динамика изменений микроциркуляции (прил. 3, табл. 14). Уменьшился объёмный кровоток: в околораневой зоне на 0 сутки после ожога показатель микроциркуляции снизился во всех исследуемых группах на 47-52% по сравнению с показателем интактных крыс.

Полученные результаты оценки уровня микроциркуляции в интактной коже и ожоговой ране (прил. 3, табл. 14) показали, что применение ранозаживляющей повязки пластины-губки на основе трескового коллагена,

а также коммерческого коллагенового раневого покрытия при ожоге к 28 суткам вызвало нормализацию показателя микроциркуляции и регуляторных факторов регуляции микрокровотока в исследуемой группе.

Таким образом, испытания ранозаживления на мелких животных (крысы) с использованием нового покрытия на основе гидрогеля ТКС-Г показали значительно более высокую эффективность в сравнении с коммерческими образцами на основе бычьего коллагена. Исследования полимерных материалов на основе коллагена на модели термического ожога могут быть использованы при разработке стратегии лечения не только ожогов, но и трофических язв, а также могут быть использованы в экстремальной военной медицине, реабилитации, в спортивной медицине.

Заключение

Разработка ранозаживляющих гелей на основе биосовместимых и биodeградируемых природных полимеров является одним из приоритетных направлений развития совместных исследований специалистов химии и биологии. Это связано с проблемой качественного лечения ран разной этиологии. В настоящее время востребованность материалов, имеющих в первую очередь высокий регенеративный потенциал, крайне высокая в силу недостатка таких материалов, одновременно активно проходит замена ассортимента традиционных перевязочных материалов (бинты, марлевые повязки и т.п.) на гидрогелевые с широкой областью действия. Раневые покрытия для заживления ран любой этиологии (гидрогели на основе натуральных полимеров) имеют ряд неоспоримых достоинств: биосовместимость, биоразлагаемость, регенерирующие и противовоспалительные свойства и т.д. Основная цель работы – получение биосовместимых, биоразлагаемых гидрогелей трехмерной структуры на основе трескового коллагена, синтезированных с использованием гетерогенного фотокатализа в присутствии сложных оксидов металлов под действием видимого света как инструмента радикального инициирования достигнута. Результаты, полученные в процессе выполнения работы, имеют важное теоретическое значение, т.к. являются развитием представлений о возможности стратегии радикальных реакций в мономерно-полимерной среде в условиях фотокатализа в присутствии сложных оксидов. Показана возможность получения в одну стадию пригодных для использования в раневых покрытиях и скаффолд-технологиях гидрогелей на основе ТК путем фотокатализа при облучении видимым светом сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$, что соответствует принципам «зеленой химии». Прикладное общественное значение состоит в том, что на основании нового подхода создания трехмерных полимерных структур получены гидрогели, которые после проведения клинических испытаний могут найти широкое применение как ранозаживляющие покрытия и скаффолды для заживления ран разной

этиологии. На основании проведенных исследований можно сделать следующие **выводы**:

1. Подобраны условия получения привитого сополимера коллаген–ПММА в условиях фотокатализа при облучении видимым светом водной дисперсии в присутствии ряда сложных оксидов, более всего на примере сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, а также устойчивых гидрогелей путем дополнения реакционной смеси добавками реагентов (ПЭГ, ТГМ-3, АК и ГА) в присутствии сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$. Новые полимерные продукты охарактеризованы по физико-химическим параметрам, ММ, содержанию коллагена, морфологии поверхности и др;
2. Показано, что желатин в реакциях привитой полимеризации в водной дисперсии со сложным оксидом $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ в условиях фотокатализа при облучении видимым светом мало отличается от коллагена;
3. Выявлены побочные реакции, протекающие в водной дисперсии ММА и ТК. Показано, что в мономерно-полимерной дисперсии сложных оксидов металлов в условиях фотокатализа при облучении видимым светом могут присутствовать продукты реакций: привитой полимеризации ММА на ТК, окисления ММА – ОММА, радикальной полимеризации ММА и ОММА, прививки ММА и ОММА на катализатор;
4. Исследован процесс ферментативного разрушения ТК и его сополимеров, который свидетельствует о замедлении гидролиза при введении в структуру материала синтетических фрагментов;
5. Изучена поверхность сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ после катализа полимеризации и определены условия его регенерации;
6. Предварительные испытания гидрогелей на основе ТК, полученных в условиях фотокатализа при облучении видимым светом $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, проявляют свойства грибостойкости, хорошей биосовместимости (по данным МТТ-теста разбавления экстрактов нецитотоксичны),

эффективны в репарации ожоговых ран, обладают хорошим влагопоглощением и устойчивостью.

Перспективы развития работы связаны с развитием исследований синтеза в одну стадию 3D-структур на основе ТК путем фотокатализа дисперсий в присутствии сложных оксидов с использованием в качестве модифицирующих добавок полисахаридов (пектина, хитозана и т.п.) для разработки новых материалов с биомиметическими свойствами для биотехнологии и медицины.

Приложение 1

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЕТЬ ФРАНЧАЙЗИНГОВЫХ ВЕТЕРИНАРНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ

ВЕТТЕСТ

WWW.VETTEST.RF

8 (800) 707-55-27

WWW.КАБИНЕТ.ВЕТТЕСТ.RF



РЕЗУЛЬТАТ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

№4495505
от 13.06.2025

Профиль: **Гистологическое исследование стандарт**

Владелец: **Соловьева А.Г.** Клиент: **ВЦ-НН**
Кличка: **КП1 (02.06.2025)** Врач: **Внешний врач**
Вид: **Крыса** Порода:
Пол: **Самец** Номер и/б:
Возраст: **6 мес**

Гистологическая картина

На препарате представлены срезы лоскута кожи. Признаки воспаления минимально выражены и представлены единичными тканевыми базофилами и лейкоцитами. Язвенный дефект отсутствует. По сравнению с остальными пробами большее количество сальных желёз. Признаков бактериальной инфекции или неоплазии не выявлено.

Заключение

Выявленные изменения в тканях условно могут соответствовать норме.

Комментарии

Интерпретация результатов напрямую зависит от технического задания эксперимента.

Врач лабораторной диагностики Заболотная А. М. подпись _____

Документ является официальной копией результата исследования



Лаборатория является участником Федеральной системы внешней оценки качества лабораторных исследований МЗ РФ ФСВОК.



Приложение 2

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЕТЬ ФРАНЧАЙЗИНГОВЫХ ВЕТЕРИНАРНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ

ВЕТТЕСТ

WWW.VETTEST.RF

8 (800) 707-55-27

WWW.КАБИНЕТ.ВЕТТЕСТ.RF



РЕЗУЛЬТАТ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

№4495500
от 13.06.2025

Профиль: **Гистологическое исследование стандарт**

Владелец: **Соловьева А.Г.** Клиент: **ВЦ-НН**
Кличка: **ОПЗ-1 (11.06.2025)** Врач: **Внешний врач**
Вид: **Крыса** Порода:
Пол: **Самец** Номер и/б:
Возраст: **6 мес**

Гистологическая картина

На препарате представлены срезы лоскута кожи. В дерме ярко выражение смешанно клеточное воспаление. У поверхности наблюдается язвенный дефект с формированием «корки» у поверхности. Весь лоскут неравномерно пропитан меланофагами, обуславливающим тёмный цвет поражения. Клетки дискретные, без особенностей. Признаков бактериальной инфекции или неоплазии не выявлено.

Заключение

Выявленные изменения в тканях соответствуют регенераторным изменениям эпителизацией с образованием рубцовой ткани и гиперпигментацией.

Комментарии

Интерпретация результатов напрямую зависит от технического задания эксперимента. Гиперпигментация может возникать как ответ на повреждение.

Врач лабораторной диагностики Заболотная А. М. подпись _____

Документ является официальной копией результата исследования



Лаборатория является участником Федеральной системы внешней оценки качества лабораторных исследований МЗ РФ ФСВОК.



Приложение 3

Таблица 14. Состояние микроциркуляции при термической травме при использовании новых материалов для закрытия раневых поверхностей

	ПМ, перф.ед.	Э, у.е.	Н, у.е.	М, у.е.	Д, у.е.	С, у.е.	ПШ, перф.ед.
Интактные крысы	9,45±0,85	12,93±1,15	9,15±0,86	8,37±0,81	5,80±0,49	3,33±0,27	1,14±0,08
Контроль 1, 0 сутки	4,86±0,52 *	14,73±1,28	11,02±0,93	11,74±0,77 *	8,26±0,52 *	4,99±0,28 *	0,92±0,03 *
Контроль 1, 7 сутки	4,97±0,38 *	14,35±1,02	10,56±0,88	11,45±0,32 *	8,05±0,27 *	5,23±0,17 *	0,93±0,02 *
Контроль 1, 14 сутки	5,39±0,16 *	13,65±1,24	10,73±0,85	10,71±0,25 *	8,16±1,07 *	4,08±0,35	0,93±0,07 *
Контроль 1, 21 сутки	6,75±0,62 *	13,63±1,09	10,68±0,77	10,66±0,54 *	8,14±0,32 *	4,66±0,85	0,92±0,06 *
Контроль 1, 28 сутки	6,99±0,51 *	13,07±1,12	10,29±1,13	10,04±1,36	7,48±0,65 *	4,12±0,36	0,98±0,01
Контроль 2, 0 сутки	5,01±0,39 *	13,81±1,05	10,87±0,93	12,02±1,34 *	7,96±0,83 *	5,04±0,20 *	0,92±0,05 *
Контроль 2, 7 сутки	5,76±0,43 *	13,56±0,90	10,88±0,95	12,10±1,18 *	7,55±0,35 *	4,21±0,15 *	0,99±0,08
Контроль 2, 14 сутки	6,54±0,36 *	13,55±1,13	10,65±0,32	10,73±0,54 *	6,93±0,27 *	4,20±0,21 *	1,10±0,05
Контроль 2, 21 сутки	7,47±0,51	12,97±0,86	9,67±0,54	9,63±0,42	6,25±0,20	3,93±0,08 *	1,03±0,04
Контроль 2, 28 сутки	7,91±0,46	12,85±1,03	10,03±0,42	9,83±0,56	6,27±0,16	3,85±0,22	1,03±0,02
Опыт 1, 0 сутки	4,53±0,48	13,59±1,04	11,65±1,23	10,84±1,32	8,64±0,33 *	5,12±0,11 *	0,94±0,02 *
Опыт 1, 7 сутки	4,97±0,29	13,42±1,30	11,25±1,04	10,12±1,19	8,02±0,56 *	4,37±0,21 *	0,93±0,01 *
Опыт 1, 14 сутки	7,52±0,34 *	13,02±1,25	10,89±1,27	9,54±1,02	7,45±0,37 *	3,95±0,30	1,04±0,03
Опыт 1, 21 сутки	8,13±0,52	12,97±1,03	10,63±1,45	9,38±0,94	6,34±0,29	3,88±0,26	1,06±0,01
Опыт 1, 28 сутки	8,44±0,61 Δ	13,76±1,27	10,48±0,72	9,23±0,36	6,12±0,30	3,88±0,29	1,11±0,03

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами (p<0,05); Δ - различия статистически значимы по сравнению с контролем 1 (p<0,05).

Благодарности. Автор выражает благодарность к.б.н. Егорихиной М.Н. за исследования цитотоксичности, д.б.н. Соловьевой А.Г. и к.б.н. Перетягину П.В. за проведение экспериментов по исследованию ранозаживления на мелких животных (крысах), д.б.н. Смирнову В.Ф. и к.б.н. Смирновой О.Н. за проведение исследований на грибостойкость, Кузьмичеву В.В. за проведение элементного анализа, к.х.н. Ворожцову Д.Л. за проведение исследования методом ПГХ, к.х.н. Малышевой Ю.Б. и д.х.н. Курскому Ю.А. за регистрацию ЯМР-спектров и их расшифровку, Кузьминой Д.А. за исследования водных растворов методом ГПХ, к.х.н. Власовой А.О. за исследования органических растворов методом ГПХ и МАЛДИ, к.х.н. Фукиной Д.Г. за исследования методом СЭМ, РМА и расшифровке результатов РФЭС, к.х.н. Белоусову А.С. и к.х.н. Корягину А.В. за получение порошков сложных оксидов металлов, к.ф.-м.н. Жижину Е.В. и Королевой А.В. за проведение исследований методом РФЭС, к.х.н. Кузнецовой Ю.Л., к.х.н. Митину А.В. и д.х.н. Сулейманову Е.В. за участие в обсуждении результатов. Особую признательность автор выражает научному руководителю д.х.н. Семенычевой Л.Л. за поддержку и участие в обсуждении результатов исследований на всех стадиях выполнения научной работы.