

На правах рукописи

Гумникова Валерия Игоревна

**Синтез диальдегиддекстрана и
диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы
и их химические превращения**

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2014

Работа выполнена на кафедре химической технологии пластических масс ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева»

Научный руководитель:

кандидат химических наук, доцент
Дятлов Валерий Александрович
доцент кафедры химической технологии
пластических масс ФГБОУ «Российский
химико-технологический университет имени
Д. И. Менделеева»

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор
Зеленецкий Александр Николаевич
заведующий лабораторией
ФГБУН Института синтетических
полимерных материалов им.Н.С.Ениколопова
Российской академии наук

доктор химических наук, доцент
Шапошникова Вера Владимировна
ведущий научный сотрудник
ФГБУН Института элементоорганических
соединений им. А. Н. Несмеянова
Российской академии наук

Ведущая организация:

ФГБУН Институт нефтехимического синтеза
им. А. В. Топчиева Российской академии наук

Защита состоится « » 2015 г. в 11.00 на заседании диссертационного
совета Д 212.204.01 при РХТУ им. Д. И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл.,
д. 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре
РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 20 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 212.204.01

Биличенко Ю. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Реконструкция дефектов кости при переломах остается актуальной проблемой. Риск инфекций вызвал повсеместное ограничение в использовании костнозамещающих материалов животного происхождения и повышенный интерес к разработке полностью синтетических полимерных композитов. Важнейшими факторами, определяющими их качество, являются скорость замещения собственной тканью и скорость биodeградации. Оба процесса должны быть строго согласованы по времени, что является сложной технической задачей. Кроме этого, композит должен содержать как минимум два типа физиологически активных веществ: белок, контролирующей жизнедеятельность клеток костной ткани, в качестве которого в работе использован коллаген, и стимулятор ранозаживления, в качестве которого предложен пептидный гормон инсулин. Удобными носителями для ковалентного связывания этих веществ с полимером композита являются диальдегидполисахариды. Однако их использование в качестве имплантатов исследовано слабо.

Основными характеристиками физиологически активных полимеров являются их химическая структура, молекулярно-массовое распределение, а также фракционная однородность, от которых в значительной степени зависит безопасность применения созданных на их основе имплантатов. Поэтому настоящая работа посвящена синтезу и исследованию основных свойств диальдегиддекстрана и диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы.

Цель и задачи диссертационной работы

- получение полностью синтетических биodeградирующих на основе диальдегиддекстрана и диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы для использования в восстановительной хирургии;
- синтез диальдегидполисахаридов различных степеней окисления на основе декстрана и карбоксиметилцеллюлозы;
- изучение химической структуры, молекулярно-массовых характеристик и фракционной однородности полисахаридных полимерных носителей;
- получение физиологически активных полимеров, содержащих инсулин и коллаген, с использованием диальдегиддекстрана и диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы в качестве полимеров носителей;
- оценка osteoкондуктивных свойств и скорости биodeградации полученных костнозамещающих композитов.

Научная новизна

- получены новые биodeградирующие полностью синтетические материалы на основе диальдегиддекстрана и диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы для использования в качестве костнозамещающих материалов;

- обнаружено, что карбоксиметилцеллюлоза окисляется в 35 раз медленнее, по сравнению с декстраном;
- показано, что молекулярная масса уменьшается с увеличением времени реакции периодатного окисления, и не зависит от степени окисления полисахарида;
- доказано существование окисленных звеньев в виде циклических полуацеталей, как в растворе, так и в твердых образцах диальдегидполисахаридов;
- синтезированы физиологически активные полимеры, содержащие инсулин ковалентно связанный диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой и коллаген, модифицированный диальдегиддекстраном, являющийся моделью присоединения костных морфогенетических белков (БМП);
- найдены условия получения фракционно-однородных полимеров – продуктов ковалентно связанного инсулина с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой;
- обнаружен эффект замедления скорости биodeградации коллагена при его химической модификации остатками обоих исследованных полисахаридов.

Теоретическая и практическая ценность результатов диссертации

- подтверждена концепция создания двух новых биоразлагаемых полисахаридных материалов для замещения костной ткани.
- разработанный метод контроля скорости биodeградации полипептидсодержащих биопротезов рекомендован для использования в экспериментальной и практической хирургии. Способ основан на химической модификации белка реакционноспособными полисахаридами и снижения, таким образом, субстратной специфичности в ферментном гидролизе. Эффективность подтверждена биологическими испытаниями *in vivo* на модели критического анастомоза большеберцовой кости крысы в ЦИТО им. Н. Н. Приорова.
- разработан способ контролируемого периодатного окисления полисахаридов различного строения с сохранением молекулярно-массового распределения исходных полимеров. Способ рекомендован к применению в биотехнологии при получении носителей лекарств на основе трудноокисляемых полисахаридов.

Методология и методы исследования. В настоящей работе использованы следующие основные методы исследований: ^{13}C ЯМР, ИК, УФ спектроскопия, гелепроникающая хроматография, атомно-силовая микроскопия, обратное иодометрическое титрование, методы исследования скорости биodeградации *in vitro* и *in vivo*, метод исследования остеокондуктивных свойств *in vivo*.

Положения, выносимые на защиту: результаты исследования химической структуры, молекулярно-массовых характеристик и фракционной однородности полисахаридных полимерных носителей, полученных на основе декстрана и карбоксиметилцеллюлозы; синтез новых физиологически активных полимеров

прививочного типа, содержащих стимуляторы роста инсулин и коллаген; результаты оценки osteoconductive свойств и скорости биодеградации костнозамещающих композитов, полученных на основе полисахаридных физиологически активных полимеров.

Личный вклад автора состоит в формулировке целей и задач исследования, постановке химического эксперимента, обработке и интерпретации полученных результатов, формулировке научных выводов.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты и положения работы были представлены в виде докладов на Международной конференции по химической технологии ХТ'12 (Москва, Россия, 2012) и XXVI Международной конференции молодых ученых по химии и химической технологии МКХТ-2012 (Москва, Россия, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), обсуждения результатов (глава 2), экспериментальной части (глава 3), выводов, списка использованной литературы. Общий объем диссертации составляет 137 страниц, включая 59 рисунков, 12 таблиц, 15 схем. Список цитируемой литературы включает 81 наименование.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы.

В обзоре литературы проведен анализ публикаций по теме диссертации. Отмечены основные направления исследований в области диальдегидполисахаридов и их применения в качестве носителей лекарственных средств.

В главе обсуждения результатов изложены оригинальные результаты по теме диссертации.

В экспериментальной части описаны основные методики получения и исследования свойств диальдегидполисахаридов. В отдельных главах приведены способы оценки и результаты определения скорости биодеградации материалов для замещения костной ткани.

В приложении представлен протокол испытаний osteoconductive свойств и скорости биодеградации, полученных материалов, исследованных в Центральном научно-исследовательском институте травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1 Химическое строение диальдегиддекстранов, полученных периодатным окислением в различных условиях

В зависимости от соотношения полисахарид : периодат окисление декстрана протекает в две стадии с образованием продуктов трех типов: II, III и IV (схема 1).

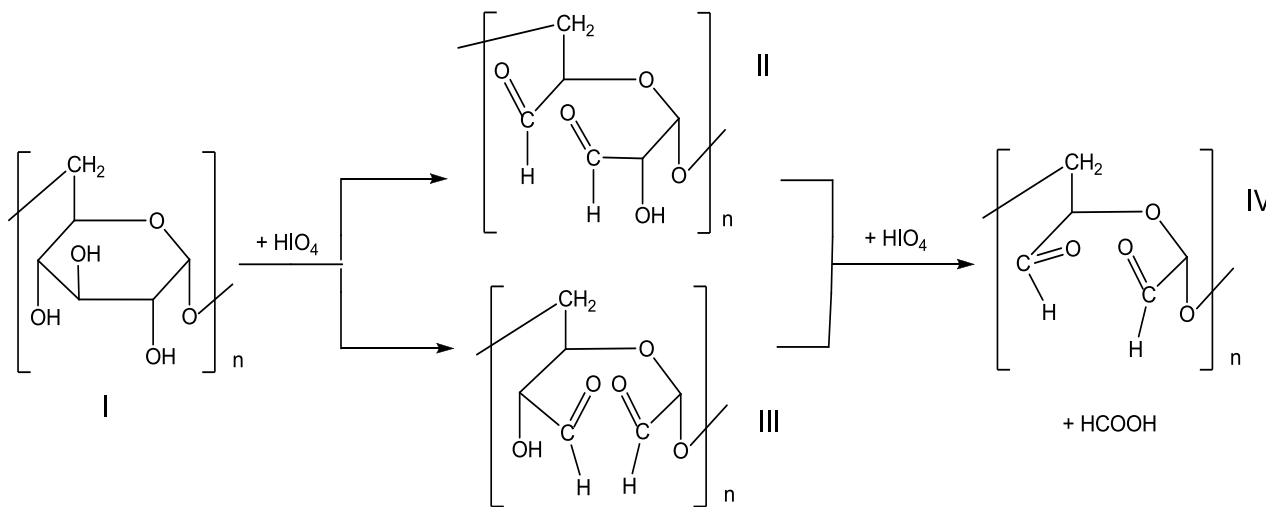
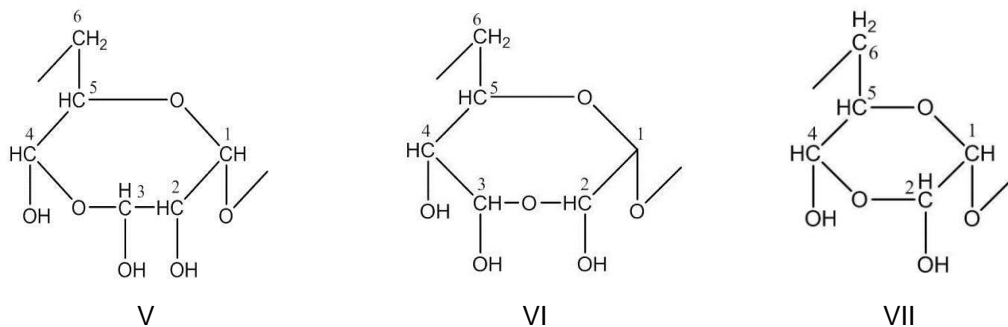


Схема 1

На первой стадии расходуется один моль периодата, при этом происходит окисление с разрывом связи C(3)-C(4) или C(2)-C(3) и образованием звеньев II и III соответственно. На второй стадии расходуется второй моль периодата, и происходит окисление образовавшегося диальдегидного звена с разрывом C(2)-C(3) в продукте II или C(3)-C(4) в продукте III соответственно с выделением муравьиной кислоты и образованием звена IV. Скорость реакции второй стадии окисления примерно равна первой, поэтому в полученном полисахариде могут одновременно присутствовать все три типа звеньев. Их соотношение зависит от соотношения периодат : ангидроглюкозное звено (АГЗ). При малых соотношениях (до 12%) образуются только звенья II и III, и количество израсходованного периодата соответствует количеству образовавшихся альдегидных звеньев. При соотношениях от 20 до 100% становится заметной реакция окисления с выделением муравьиной кислоты, при этом образуется полимер, содержащий все три типа звеньев. При соотношениях выше 100 мол. % периодата практически все звенья типа II и III доокисляются до звена IV с выделением муравьиной кислоты

Степень окисления декстрана ($\gamma_{\text{ок}}$) мало зависит от исходной молекулярной массы полимера и определяется только соотношением периодат : декстран.

Установлено, что как в твердом виде, так и в растворе окисленные звенья существуют в виде циклических полуацеталей (V, VI, VII). Альдегидных групп в свободной или гидратированной форме в полимерах не обнаружено.



В спектрах ЯМР ^{13}C полностью окисленного диальдегиддекстрана (ДАД), снятых из ДМСО- D_6 , из водного раствора в D_2O , и из твердого образца отсутствуют сигналы углерода карбонильной группы. В целом спектры идентичны с учетом очевидной разницы в разрешении (рисунок 1).

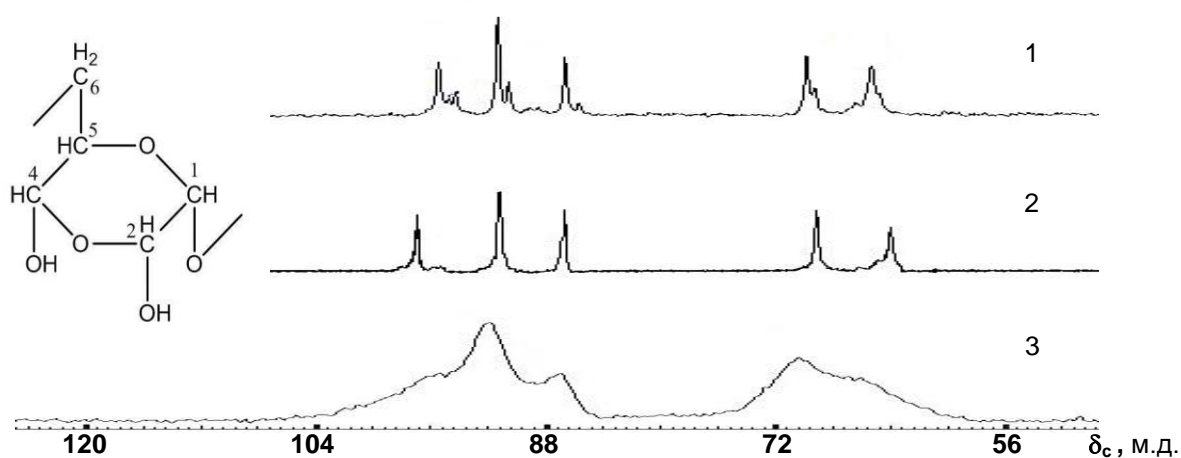
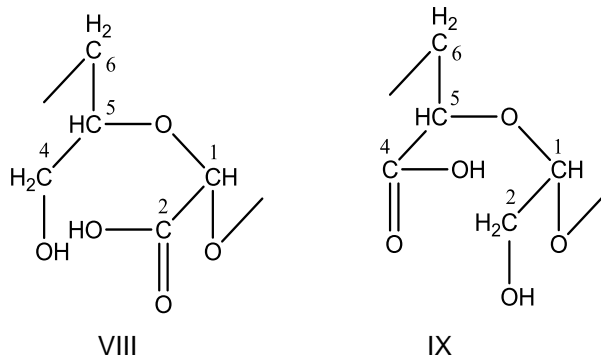


Рисунок 1 – Спектры ЯМР ^{13}C ДАД, $\gamma_{\text{ок}}=95,2$ снятые: 1 - из раствора в D_2O ; 2 - из раствора в ДМСО- D_6 ; 3 - из твердого тела

Теоретически возможно образование полуацетальных связей альдегидных групп окисленных декстранов с гидроксильными группами соседних молекул декстрана, однако это должно приводить к образованию сшивок и резкому увеличению молекулярной массы. Таких взаимодействий не обнаружено.

Спектры ЯМР ^{13}C диальдегиддекстранов низких степеней окисления не содержат сигналов карбонильных атомов углерода. Они содержат пять сигналов ацетальных углеродов, четыре из которых 101,1; 94,74; 89,64; 88,17 м.д. относятся к окисленным звеньям, а пятый - к ангидроглюкозному звену и три сигнала неацетальных углеродов окисленных звеньев C(4) 80,80; C(2) 79,61; C(6) 65,55 м.д.

В щелочной среде происходит реакция внутримолекулярного диспропорционирования с образованием звеньев VIII и IX. При этом размыкается полуацетальный цикл, и в спектрах ЯМР ^{13}C появляются сигналы 156,1 и 155,0 м.д. углеродов карбоксильных групп. Эти структуры гидролитически не устойчивы, и их образование сопровождается резким снижением молекулярной массы.



2 Химическое строение диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы, полученной периодатным окислением в различных условиях

В процессе окисления карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) происходит разрыв связи С(2)-С(3) ангидроглюкозного цикла. В ее молекуле, как и у других 1-4 полисахаридов, имеется только одна связь способная к периодатному окислению, поэтому образуется только один вариант окисленного звена. Основная реакция сопровождается побочными: диспропорционированием и доокислением (схема 2).

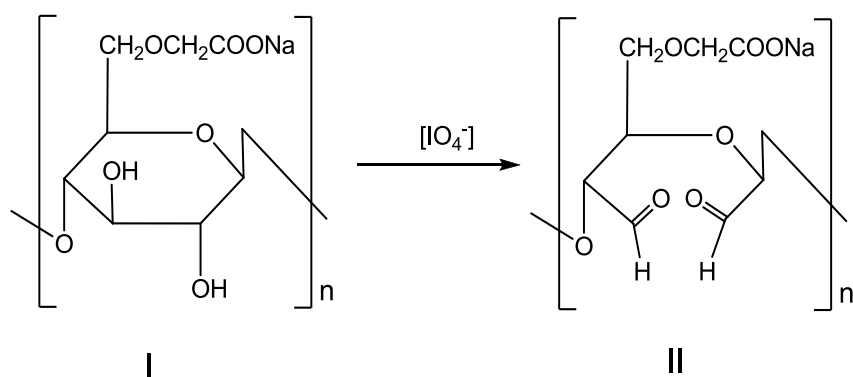


Схема 2

Также как и в случае с ДАД, альдегидные группы в окисленных звеньях ДАКМЦ существуют в виде циклических полуацеталей. В спектрах ЯМР ¹³С отсутствуют сигналы альдегидных групп в области 195-200 м.д. С увеличением степени окисления ДАКМЦ возрастает как количество, так и интенсивность сигналов полуацетальных атомов углерода С-О-С в области 85-100 м.д. Это связано с увеличением числа и содержания диастереомерных полуацетальных структур.

Для подтверждения структуры окисленных полимеров и более точного отнесения сигналов в спектрах ¹³С были исследованы продукты восстановления ДАД и ДАКМЦ боргидридом натрия. В результате реакции образуются разомкнутые диолы, а в спектрах ЯМР ¹³С исчезают сигналы углеродов ацетальных циклов. Также как и ДАД, ДАКМЦ не содержит свободных альдегидных групп ни в растворе, ни в твердом виде.

3 Влияние строения основной цепи сополимеров на скорость периодатного окисления и молекулярно-массовые характеристики образующихся диальдегидполисахаридов

Механизм реакции периодатного окисления (реакция Малапрада) предусматривает образование на первой стадии циклического комплекса, который затем разрушается с окислением С-С связи и разрывом цикла (схемы 3, 4).

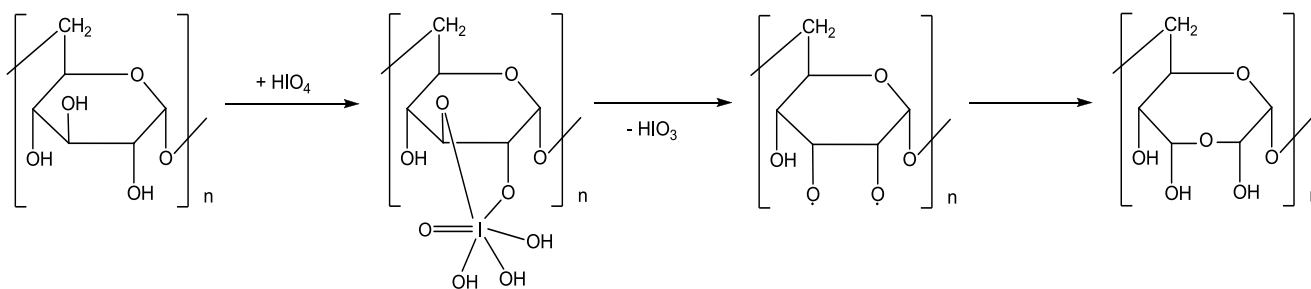


Схема 3

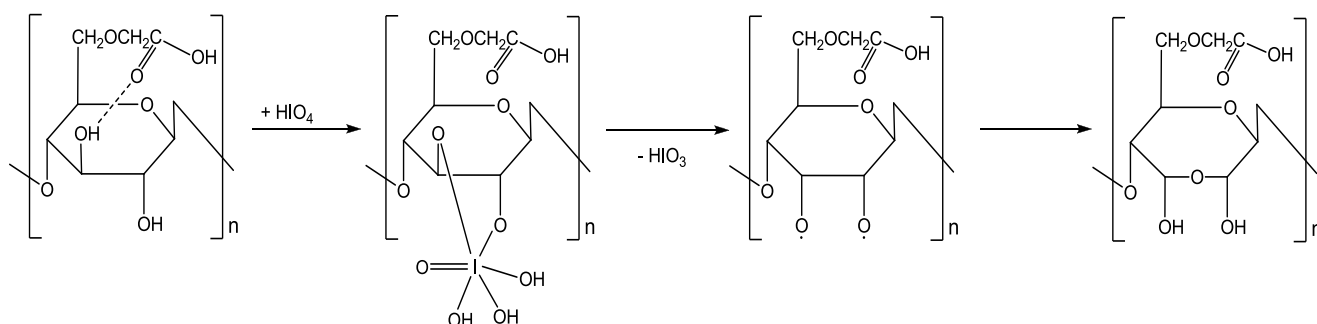


Схема 4

В случае ДАД скорость реакции не зависит от молекулярной массы исходного полимера, полностью заканчивается за 2 часа и не сопровождается снижением его молекулярной массы.

ОН-группа при третьем углеродном атоме КМЦ связана водородной связью с карбоксильной группой, что затрудняет образование комплекса с периодат-ионом и существенно замедляет реакцию окисления. Процесс протекает значительно медленнее и заканчивается за трое суток в темноте при мольном соотношении периодат : ангидроглюкозное звено (АГЗ) равном 1:1.

Остаточные некарбоксиметилированные ангидроглюкозные циклы КМЦ, в которых отсутствует ингибирующее влияние карбоксильной группы, окисляются быстрее и расходуются в первую очередь. Это особенно заметно в образцах с низкой степенью карбоксиметилирования (менее 80) и степенью окисления $\gamma_{ок} < 10$.

Параллельно с основной реакцией протекают три побочных. При повышенной температуре в присутствии избытка периодата ускоряется реакция доокисления альдегидных групп до кислотных (схема 5).

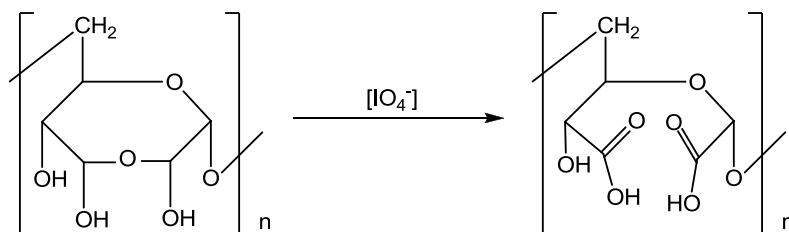


Схема 5

Кроме того, в щелочной среде возможно диспропорционирование двух альдегидных групп окисленного цикла с образованием ациклической оксикислоты (схема б).

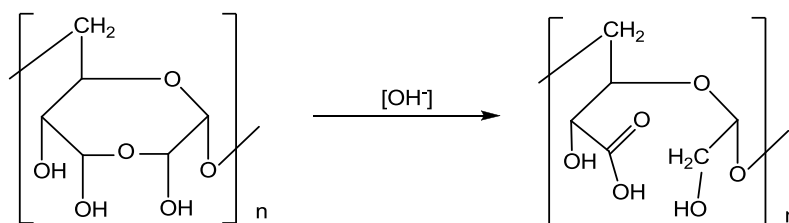


Схема б

Обе реакции приводят к размыканию циклов с образованием звеньев, по которым легко протекает деструкция.

Третьей побочной реакцией является гидролиз основной цепи, приводящий к снижению молекулярной массы. В случае быстрого окисления декстрана гидролиз не столь заметен. Исследование молекулярно-массовых характеристик показало, что для полимеров, содержащих менее 20 окисленных звеньев на 100 АГЗ ($\gamma_{ок} < 20$) кривые ММР практически не отличаются от исходных. Увеличение степени окисления приводит к падению молекулярной массы без изменения полидисперсности (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние гомогенного периодатного окисления на молекулярно-массовые характеристики декстранов

Исходный декстран	Диальдегиддекстран, степень окисления, $\gamma_{ок}$	M_w , кДа	M_n , кДа	M_w/M_n
Полиглюкин	0	57,6	22,4	2,5
	6,0	57,0	26,1	2,2
	27,0	46,0	16,0	2,8
	84,0	24,2	11,0	2,2
Т-70	0	71,9	47,4	1,5
	29,0	64,3	45,9	1,4
Т-20	0	22,6	17,1	1,3
	33,0	19,4	14,9	1,3

Синтез ДАКМЦ требует более суток, и гидролиз основной цепи становится весьма заметным побочным процессом. Таким образом, степень окисления определяется соотношением КМЦ : периодат, а снижение молекулярной массы - временем реакции. В основном оно приходится на завершающий этап реакции, когда гидролиз проходит с разрывом уже образовавшихся окисленных звеньев. Этого можно избежать, если реакцию проводить при слегка пониженной температуре (+10°C), либо в течение короткого времени. Таким способом были получены высокомолекулярные образцы ДАКМЦ с $M_w=130$ кДа. Изучение молекулярно-

массовых характеристик методом гельпроникающей хроматографии показало, что при периодатном окислении резко снижаются молекулярная масса и полидисперсность ДАКМЦ при этом разрыв цепи носит статистический характер, ММР сужается и приближается к Гауссовому, а полидисперсность стремится к наиболее вероятному значению $M_w/M_n=2$ (рис. 2).

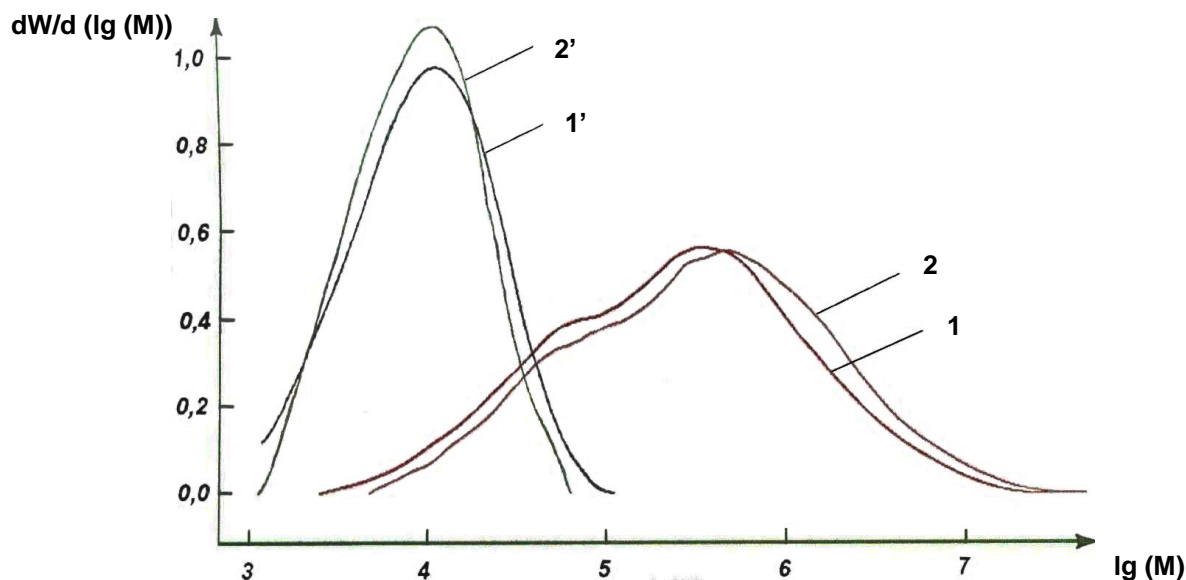


Рисунок 2 – Кривые молекулярно-массового распределения: 1, 2 – КМЦ; 1', 2' - ДАКМЦ; 1, 1' - фармацевтическая «Blanose», 2, 2' - нефармацевтическая «Blanose»

Исследование гидролитической стабильности ДАД показало, что он вполне устойчив в нейтральной среде, однако даже в слабокислых условиях при $pH=5,5$ наблюдается падение молекулярной массы со временем. Полидисперсность приближается к наиболее вероятной ($M_w/M_n=2$) - типичной для статистического разрыва цепей. При повышении температуры скорость гидролиза существенно возрастает. Нагревание до $60^{\circ}C$ в течение 0,5 часа приводит к резкому уменьшению молекулярной массы (таблица 2).

Таблица 2 – Изменение молекулярно-массовых характеристик ДАД в процессе гидролиза при $25^{\circ}C$

$\gamma_{ок}$	pH	Время, ч	M_w , кДа	M_n , кДа	M_w/M_n
6	6,5	1	57,0	26,1	2,2
6		170	53,7	26,4	2,0
10		1	51,5	23,6	2,2
10		24	49,2	28,1	1,7
10	5,5	1	49,6	27,3	1,8
10		24	47,1	26,5	1,8
10		96	38,2	17,4	2,2
30		1	44,8	18,7	2,4
30		24	40,2	18,3	2,2
30		96	28,2	10,8	2,6
30	3,5	0,5*	26,4	9,4	2,8

* $t = 60^{\circ}C$

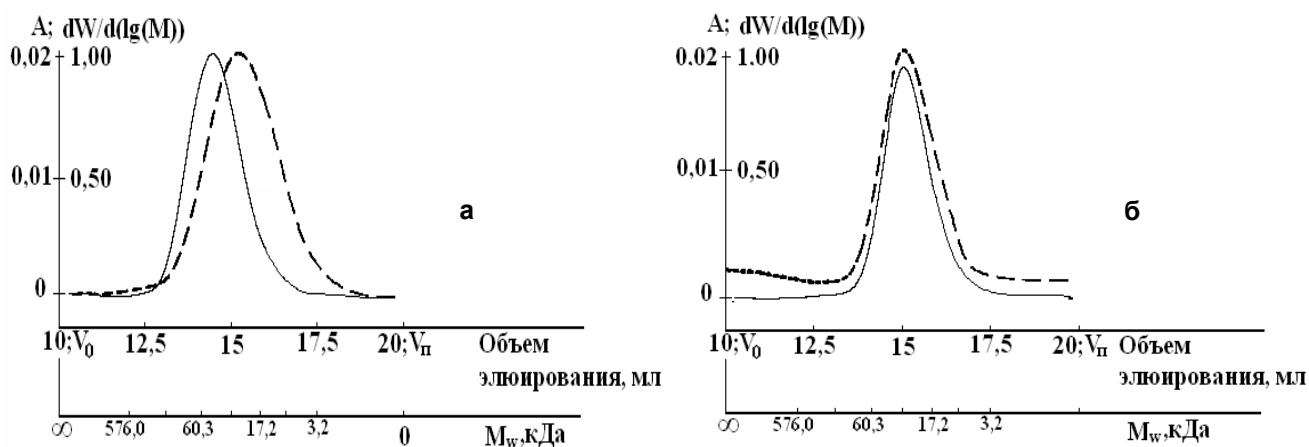
В щелочных растворах ускоряется реакция дипропорционирования ДАД с образованием гидролитически не стабильных разомкнутых оксикислот (схема б).

Восстановление альдегидных групп так же приводит к образованию продуктов с низкой гидролитической устойчивостью.

Оба типа полимеров ДАД и ДАКМЦ, образующиеся при периодатном окислении, относительно устойчивы к гидролизу в условиях, когда окисленные звенья замкнуты в ацетальные циклы. Их разрушение приводит к резкому падению молекулярно-массовых характеристик пропорциональному степени окисления ($\gamma_{ок}$).

4 Фракционная неоднородность

Фракционную неоднородность полимеров изучали методом гельпроникающей хроматографии (ГПХ) с использованием двух последовательно соединенных детекторов: рефрактометрического и мультиволнового ультрафиолетового детектора при длине волны поглощения окисленных звеньев (рисунки 3, 4).

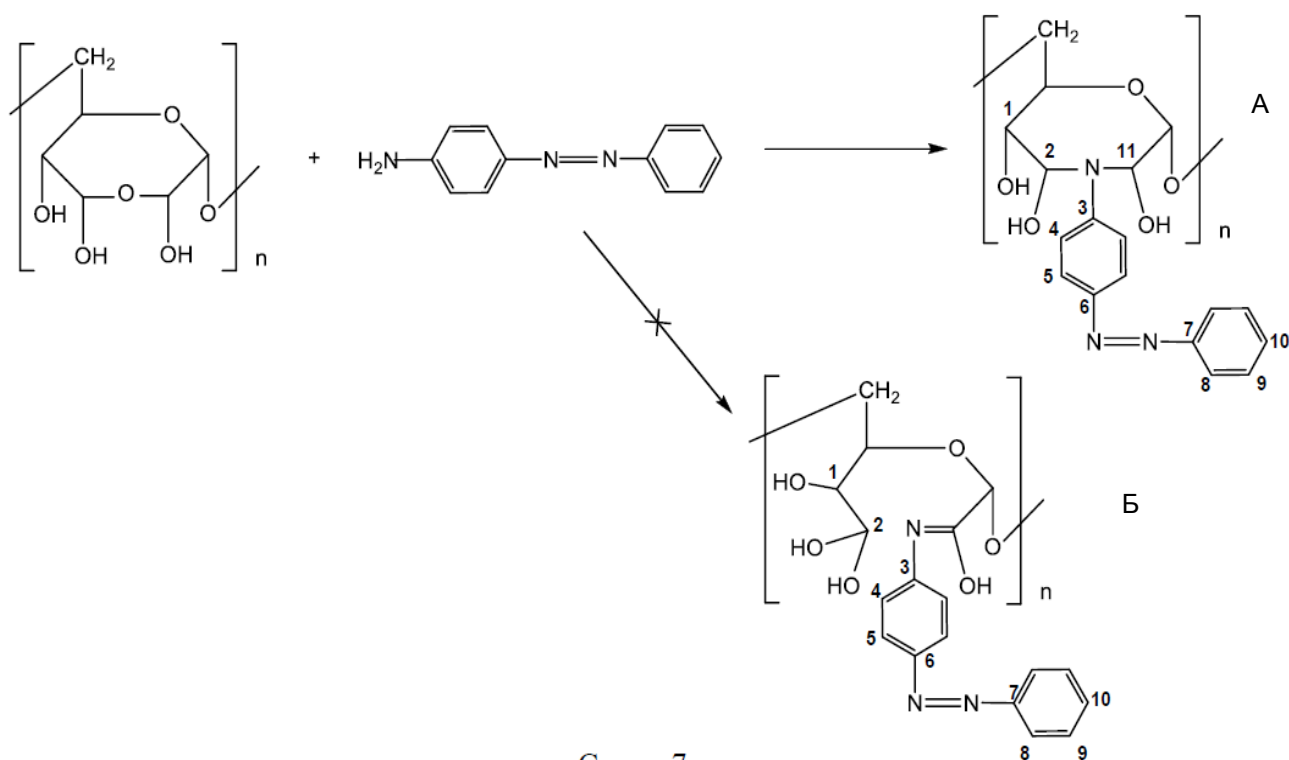


Рисунки 3, 4 – Кривые ГПХ ДАКМЦ: а - полученной на первой стадии периодатного окисления; б - полученной на последней стадии периодатного окисления
 ————— рефрактометрическое детектирование, - - - - - УФ детектирование

В случае окисления низковязких декстранов средней молекулярной массы в гомогенных условиях никакой фракционной неоднородности не наблюдается. Окисленные звенья равномерно распределены по фракциям полимера разной молекулярной массы. Окисление высоковязких растворов ДАКМЦ при низкой температуре сопровождается образованием фракционно-неоднородного продукта. Диффузия периодата внутрь набухших клубков затруднена, поэтому первыми окисляются фракции, имеющие относительно невысокую молекулярную массу и вязкость, а также поверхностные группы клубков высокомолекулярной фракции. И только на завершающих стадиях реакции происходит доокисление высокомолекулярных фракций с выравниванием фракционной однородности. При этом образуется полимер существенно сниженной молекулярной массой. Повышение температуры позволяет увеличить скорость диффузии и снизить вязкость, что приводит к исчезновению фракционной неоднородности. Однако, при этом резко ускоряется гидролиз, и побочная реакция доокисления альдегидных групп до кислотных.

5 Присоединение белков

Короткие пептиды и белки взаимодействуют с полисахаридами с образованием ковалентно-связанных продуктов, однако тип связи до сих пор вызывает дискуссии. При взаимодействии с ациклическими альдегидами в мольном соотношении 1:1 первичные амины образуют обычные Шиффовы основания. Однако, в случае циклических диальдегидов присоединяется только одна молекула амина вместо двух. Для установления строения образующихся соединений в качестве модельного первичного амина в работе использовали *p*-аминоазобензол. Оказалось, что только одна его молекула способна связываться с окисленным сахаридным звеном с образованием циклического фрагмента структуры А (схема 7), что согласуется с ЯМР ^{13}C спектром образующегося полимера (таблица 3).



В УФ-спектре исчезает коротковолновая полоса поглощения amino-группы, не находящейся в сопряжении с ароматическим ядром, в области 315 нм с $\epsilon=20202 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, однако остается неизменной длинноволновая полоса поглощения азо-связи 490 нм с $\epsilon=8838 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$. Сопряженная система с азометиновой связью структуры Б не образуется, что подтверждается отсутствием батохромного сдвига, характерного для аминогруппы в сопряжении с азо-связью, аналогичному спектру *p*-аминоазобензола в этиловом спирте (рисунок 5).

Определить точное химическое строение продуктов присоединения инсулина к диальдегиддекстрану не представляется возможным, однако в ЯМР ^{13}C спектрах присутствуют сигналы заместителей аминокислотных фрагментов ковалентно-связанных с окисленными полисахаридами (рисунок 6). Контроль количества связанного пептида проводили методом УФ-спектроскопии.

Таблица 3 – Сравнение расчетных и экспериментально найденных химических сдвигов атомов углерода в спектре ЯМР ^{13}C продуктов взаимодействия п-аминоазобензола с диальдегиддекстраном

Номера атомов С	Значения химических сдвигов, δ , м. д.		
	Найдено в спектре полученного продукта	Вычислено для структур	
		А	Б
1	80,6	79,3	80,1
2	90,7	87,0	90,1
3	152,5	151,8	149,7
4	115,9	111,7	122,6
5	122,8	125,1	116,8
6	145,0	144,8	147,9
7	153,5	152,7	152,7
8	124,6	123,0	123,0
9	130,0	129,0	129,0
10	131,0	130,9	130,9
11	96,3	91,4	163,7

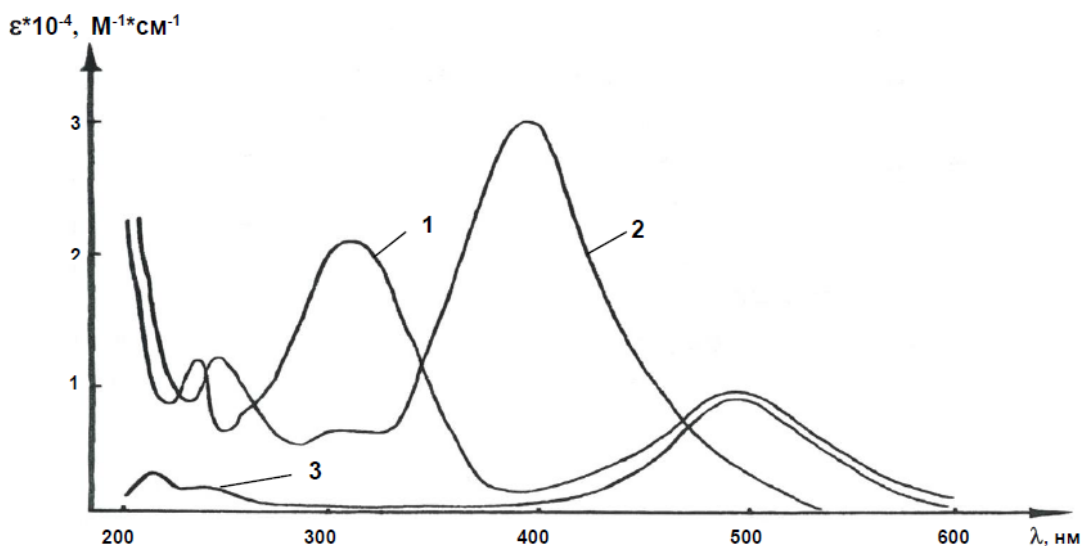


Рисунок 5 – УФ-спектры: 1 – п-аминоазобензол в 0,1М НСl; 2 – п-аминоазобензол в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; 3 – продукт структуры А в 0,1М НСl

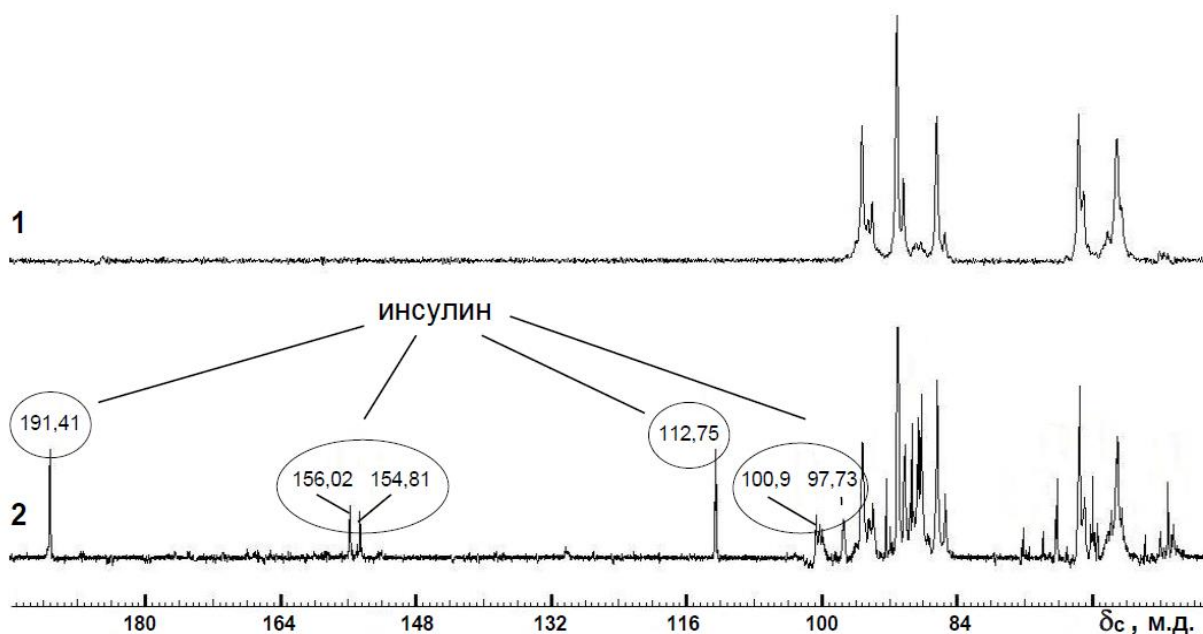


Рисунок 6 – ЯМР ^{13}C спектры: 1 – высокоокисленный диальдегиддекстран, 2 – продукт ковалентного присоединения ДАД с инсулином

6 Получение костнозамещающих композитов

Костнозамещающие композиты включали следующие компоненты:

- ДАД, ДАКМЦ - полимеры-носители;
- Коллаген – активатор адгезии тромбоцитов;
- Гекса-[п-формилфенокси]циклотрифосфазен (ГФЦФ), гекса-[п-карбоксилфенокси]циклотрифосфазен (ГКЦФ) – регуляторы скорости биоразложения;
- Инсулин – стимулятор ранозаживления;
- Наногидроксиапатит (НГА) – основа неорганического матрикса костных тканей;
- Амикацин – бактерицидный антибиотик группы аминогликозидов, защищающий от бактериальной инфекции;
- Хондроитин сульфат - мукополисахарид, стимулирующий рост хрящевой ткани.

Композит получали в соответствии с нижеприведенной блок-схемой (схема 8).

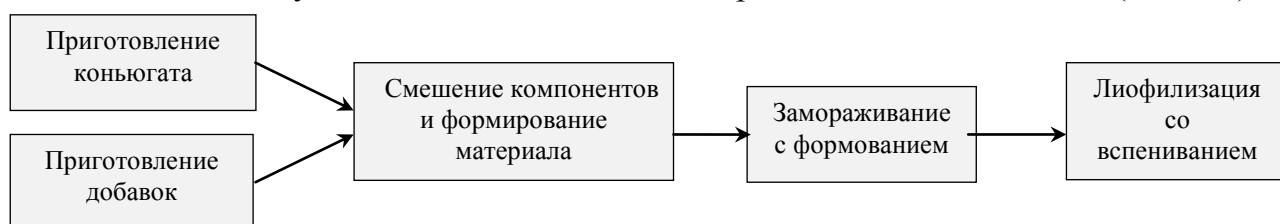


Схема 8 – Блок-схема приготовления образцов для испытаний

На первом этапе смешением компонентов в соответствии с таблицей 4 получали исходную суспензию, которую затем замораживали и вспенивали при лиофилизационной сушке.

Таблица 4 – Компоненты для получения костнозамещающего композита на основе ДАД, как полимера-носителя

№ образца на рис. 7	Тип коллагена Растворимый/ Нерастворимый (Р/Н)	Конъюгат		НГА, мг
		Состав, носитель : коллаген	Количество	
1	Р	3,28:1	100	100
2	Р	3,28:1	100	100
3	Р	3,28:1	10	190
4	Н	26,16:1	100	100
5	Н	5,22:1	100	100
6	Н	5,22:1	10	190
7	Н	1,044:1	10	190
8	Р	-	100	100
9	Р	-	10	190
10	Н	-	100	100
11	Н	5:1	200	-
12		5:1	200	
13	Р	1*:9	180	-

*В качестве носителя использован ГФЦФ.

7 Изучение биodeградации пористого композита

Биоразложение имплантата происходит по двум механизмам: ферментативный гидролиз и клеточная атака. Поэтому в работе использовали два типа регуляторов скорости биodeградации. Первый тип – производные циклофосфазена – резко

замедляют скорость ферментативного гидролиза и отлично зарекомендовали себя в опытах *in vitro*. Второй тип – инсулин и коллаген – вещества, снижающие интенсивность воспаления, улучшающие ранозаживление, и, соответственно, снижающие скорость биоразложения под действием клеточных факторов. Их действие невозможно оценить в опытах *in vitro*, поэтому исследование проводилось методом *in vivo*. Цель исследования – определить, какой тип регуляторов необходим для создания пористого композита. Этот выбор напрямую зависит от того, какой из механизмов является доминирующим в процессе биодеградации. Скорость биодеградации в работе определяли методом *in vivo* путем подкожной имплантации образца в спинную область крысы.

Регуляторы скорости биодеградации на основе циклотрифосфазенов резко замедляют скорость рассасывания образца, однако вызывают интенсивное нагноение и неуправляемую воспалительную реакцию на первой стадии пребывания имплантата в организме. Это объясняется кислым характером замедлителей и локальным выделением токсичных продуктов гидролиза. Введение в композицию наногидроксиапатита (НГА) – основного неорганического компонента костной ткани не вызывает негативной реакции на стадии первичного воспаления, однако после начала биоразложения развивается интенсивное нагноение, связанное с активацией макрофагов мелкими нерастворимыми частицами НГА, выделяющимися из образца. Такой продукт привлекает большое количество фагоцитирующих клеток, что сопровождается вторичным воспалением и нагноением на поздних стадиях.

Введение в композицию коллагена и инсулина резко ускоряет ранозаживление, как на первой, так и на второй стадиях. Активирование фагоцитирующих клеток не происходит, и образец оказывается устойчивым к биодеградации даже в отсутствие специальных ингибиторов ферментативного гидролиза. Интенсивность процесса оценивали по уменьшению размера образцов после имплантации (рисунок 7). Продукты взаимодействия диальдегидполисахаридов с коллагеном деградируют при подкожной имплантации значительно медленнее исходного коллагена, что, вероятно, связано с изменением субстратной специфичности продукта и его повышенной устойчивости к действию протеолитическим ферментами.

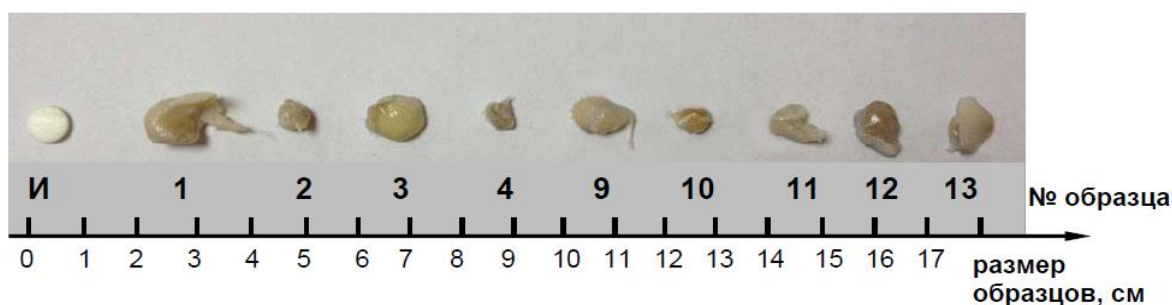


Рисунок 7 – Изменение размера образцов пористого композитного материала при подкожной имплантации. И – исходный образец. Состав образцов приведен в таблице 4. Образцы 5, 6, 7, 8 полностью биоразградируются

8 Остеокондуктивные свойства пористого композитного материала

Остеокондуктивные свойства изучали в опытах *in vivo*, используя модель критического костного анастомоза большеберцовой кости крысы.

Исследуемый композит помещали в анастомоз одной из задних конечностей, а материал сравнения – диминерализованный костный матрикс – в анастомоз второй конечности крысы (рисунок 8). Остеокондуктивные свойства оценивали через 30 и 60 дней после имплантации с использованием рентгеновского томографа (рисунок 9).

Введение образцов, содержащих НГА, вызывает нагноение на второй стадии ранозаживления. Присутствие фосфазенов в имплантате приводит к аналогичной реакции на первой стадии. Обе добавки ухудшают остеокондуктивные свойства. Присутствие в материале инсулина позволяет избежать воспаления, как на первой, так и на второй стадиях ранозаживления. Однако материал быстро рассасывается. Полученные композиты могут быть использованы в качестве хорошей основы для костнозамещающих материалов при условии замедления скорости их биоразложения.



Рисунок 8 – Исследуемый образец, помещенный в анастомоз одной из задних конечностей крысы



Рисунок 9 – Снимок анастомоза большеберцовых костей крысы, сделанный с помощью рентгеновского томографа

ВЫВОДЫ

1. На основе диальдегиддекстрана и диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы получены новые биodeградирующие полностью синтетические полимерные композиты для использования в восстановительной хирургии.

2. Обнаружено, что карбоксиметилцеллюлоза окисляется в 35 раз медленнее, по сравнению с декстраном.

3. Показано, что молекулярная масса полисахаридов уменьшается с увеличением времени реакции периодатного окисления, и не зависит от степени окисления полисахарида.

4. Доказано существование окисленных звеньев в виде циклических полуацеталей, как в растворе, так и в твердых образцах диальдегидполисахаридов.

5. Синтезированы физиологически активные полимеры, содержащие инсулин ковалентно-связанный с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой, и коллаген, модифицированный диальдегиддекстраном, являющийся моделью присоединения костных морфогенетических белков (БМП).

6. Найдены условия получения фракционно-однородных полимеров – продуктов связывания инсулина с диальдегидполисахаридами.

7. Обнаружен эффект замедления скорости биodeградации коллагена при его химической модификации остатками обоих исследованных полисахаридов.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Гумникова В. И., Дятлов В. А., Т. А. Гребенева В. А., Круппа И. С., Киреев В. В., Бахмутов В. И. Изучение химического строения диальдегиддекстранов, полученных периодатным окислением в различных условиях // Пластические массы. 2013. № 6. С. 44-50.

2. Дятлов В. А., Гумникова В. И., Гребенева Т. А., Круппа И. С., Рустамов И. Р., Киреев В. В., Малеев В. И. Изучение химического строения диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы, полученной периодатным окислением в различных условиях // Пластические массы. 2013. № 8. С. 6-13.

3. Dyatlov V.A., Kruppa I. S., Mamaeva S. A., Kutergina I. Yu., Gumnikova V. I., Grebeneva T. A., Kireev V. V. Change of polysaccharide molecular – weight distribution and fraction homogeneity after periodate oxydation. // Chemistry of Natural Compounds. 2014. V. 50. I. 6. P. 973-977.

4. Долгова А. А., Чапала П. П., Круппа И. С., Гумникова В. И., Дятлов В. А. Химическое строение диальдегиддекстранов – полимеров-носителей в медицинских композициях для замещения костной ткани // Успехи в химии и химической технологии. 2012. Т. 26. № 3 (132). С. 91-95.

5. Чапала П. П., Долгова А. А., Круппа И. С., Гумникова В. И., Дятлов В. А. Особенности химического строения продуктов гомогенного периодатного окисления карбоксиметилцеллюлозы // Успехи в химии и химической технологии. 2012. Т. 26. № 4 (133). С. 123-126.

6. Чапала П. П., Дятлов В. А., Долгова А. А., Гумникова В. И. Влияние периодатного окисления на молекулярно-массовые характеристики диальдегидполисахаридов // Химическая технология: Тез. докл. Международной конференции по химической технологии «ХТ'12». Москва, 2012. Т. 3. С. 26-27.

7. Долгова А. А., Дятлов В. А., Чапала П. П., Гумникова В. И. Таутометрия в окисленных звеньях диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы // Химическая технология: Тез. докл. Международной конференции по химической технологии «ХТ'12». Москва, 2012. Т. 3. С. 74-75.

8. Гумникова В. И., Дятлов В. А., Чапала П. П., Долгова А. А. Структура окисленных звеньев продуктов периодатного окисления клинического декстрана «Полиглюкин» // Химическая технология: Тез. докл. Международной конференции по химической технологии «ХТ'12». Г. Москва, 2012. Т. 3. С. 300-302.