

Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева
Кафедра химической технологии пластических масс

На правах рукописи

Гумникова Валерия Игоревна

**СИНТЕЗ ДИАЛЬДЕГИДДЕКСТРАНА И
ДИАЛЬДЕГИДКАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ
И ИХ ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ**

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
химических наук

Научный руководитель:

к.х.н., доцент Дятлов В. А.

Москва – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1 Полисахариды, применяемые в качестве полимеров-носителей биологически активных веществ.....	11
1.1.1 Декстран	12
1.1.2 Диальдегиддекстран.....	13
1.1.3 Карбоксиметилцеллюза	14
1.1.4 Диальдегидкарбоксиметилцеллюза.....	15
1.1.5 Применение полисахаридов в качестве веществ, замедляющих биодegradацию белков.....	16
1.1.6 Присоединение белков к окисленным полисахаридам	17
1.2 Композиционные материалы: состав и свойства	18
1.2.1 Композиционные материалы и соединения, применяемые в имплантации при замещении кости	20
1.2.2 Требования к композитам, применяемым для замещения кости	20
1.2.3 Коллаген – белок соединительной ткани.....	23
1.2.4 Биодegradация коллагена и препаратов на его основе.....	25
1.2.5 Композиционные материалы на основе коллагена и гидроксиапатита	30
1.2.6 Инсулин – гормон, стимулирующий ранозаживление.....	31
1.2.7 Фосфазены и их применение, в качестве веществ, замедляющих биодegradацию белков, и носителей лекарственных средств	32
1.2.8 Биоразлагаемые полифосфазены.....	33
1.2.9 Цианакрилатные связующие.....	35
1.2.10 Микроструктура носителя.....	37
1.3 Строение костной ткани	38
1.4 Регулирование скорости биодegradации	39
ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	43

2.1 Химическое строение диальдегиддекстранов, полученных периодатным окислением в различных условиях.....	43
2.2 Химическое строение диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы, полученной периодатным окислением в различных условиях.....	53
2.3 Влияние структуры основной цепи сополимеров на скорость периодатного окисления и молекулярно-массовые характеристики образующихся диальдегидполисахаридов.....	63
2.4 Фракционная неоднородность	71
2.5 Присоединение белков.....	75
2.6 Получение костнозамещающих композитов.....	79
2.7 Исследование скорости биodeградации <i>in vitro</i>	82
2.8 Изучение в опытах <i>in vivo</i> скорости биodeградации полимерного конъюгата коллагена с диальдегидполисахаридами	85
2.9 Исследование способности имплантата вызывать рост клеток и их дифференциацию в клетки костного пути регенерации	88
2.10 Способность полисахаридного пористого имплантата прорастать костной тканью в опыте <i>in vivo</i> (остеокондуктивные свойства).....	90
ВЫВОДЫ	94
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	95
3.1 Описание свойств исходных соединений, вспомогательных веществ и растворителей	95
3.1.1 Исходные соединения.....	95
3.1.2 Вспомогательные вещества.....	97
3.1.3 Растворители.....	98
3.2 Физические методы исследования	99
3.2.1 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса	99
3.2.2 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса в твердом теле	100
3.2.3 Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием.....	100
3.2.4 Ультрафиолетовая спектроскопия.....	100

3.2.5 Гель-проникающая хроматография.....	101
3.2.6 Атомно-силовая микроскопия	102
3.2.7 Обратное иодометрическое титрование	102
3.2.8 Исследование скорости биodeградации методом <i>in vitro</i>	103
3.2.9 Исследования биodeградации методом <i>in vivo</i>	106
3.2.10 Исследование полисахаридных композиций для замещения костной ткани на экспериментальной модели сегментарной резекции большеберцовой кости крысы методом <i>in vivo</i>	107
3.2.11 Клеточная модель остеоиндукции – способности вызывать рост клеток и их дифференциацию по остеогенному пути	111
3.2.12 Определение степени кальцификации клеточной культуры. Оценка способности вызывать дифференциацию клеток по остеогенному пути (превращаться в клетки выращивающие кость)	112
3.2.12 Определение активности щелочной фосфатазы в клеточной культуре. Оценка способности вызывать рост и деление клеток.....	112
3.3 Методики получения полупродуктов и конечных веществ	113
3.3.1 Синтез диальдегиддекстрана	113
3.3.2 Синтез диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы	113
3.3.3 Восстановление диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы	114
3.3.4 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе натриевой соли диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы и коллагена	114
3.3.5 Синтез фосфазен-белкового конъюгата на основе гекса-[п- формилфенокси]циклотрифосфазена и коллагена «СИНАП».....	115
3.3.6 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе диальдегиддекстрана и коллагена «Ниармедик».....	115
3.3.7 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе диальдегиддекстрана и коллагена «СИНАП».....	116
3.3.8 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе низкоокисленного диальдегиддекстрана и инсулина.....	116

3.3.9 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе высокоокисленного диальдегиддекстрана и инсулина	116
3.3.10 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе натриевой соли диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы и инсулина	117
3.3.11 Изготовление таблеток для подкожной имплантации	117
3.3.12 Изготовление композиций для испытания остеокондуктивности.....	119
3.3.13 Изготовление таблетки для определения пористости образца при помощи атомно-силовой микроскопии	120
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	121
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	122
ПРИЛОЖЕНИЕ А_Протокол биологических испытаний	130

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Реконструкция дефектов и оптимизация процесса заживления повреждений костной ткани является актуальной проблемой в медицине, решить которую помогают исследования в области химии высокомолекулярных соединений. В качестве костнозамещающих материалов до последнего времени широко использовались продукты на основе бычьей кости, лучшим из которых остается деминерализованный костный матрикс. Однако в настоящее время их использование ограничено или полностью запрещено в большинстве развитых стран. Это связано с осознанием опасности применения имплантатов животного происхождения, которые не могут гарантировать отсутствие прионных и вирусных инфекций, не удаляемых стерилизацией. Дефицит костнозамещающих материалов вызвал повышенный интерес к материалам на основе синтетических полимеров и биополимеров микробного происхождения, исключающих риск прионных инфекций. Кроме этого, исследования последних лет показали, что стерильности и биоинертности недостаточно для костнозамещающего материала. Он должен активно участвовать в ранозаживлении и содержать набор физиологически активных веществ, выделяющихся в кровоток.

Важнейшими факторами, определяющими качество костных имплантатов, являются скорость их замещения собственной тканью и скорость биodeградации. Оба процесса должны быть строго согласованы по времени, что является сложной технической задачей. Рост костной ткани сильно зависит от пола, возраста и сопутствующих заболеваний и отличается в несколько раз от больного к больному. Фактически требуется создание линейки изделий с разной репаративной способностью. Это делает остроактуальными исследования в области физиологически активных имплантатов с контролируемой скоростью замещения костной тканью и биodeградацией.

Кроме этого, материал имплантата должен содержать как минимум два типа физиологически активных веществ: белки, контролирующие жизнедеятельность остеобластов - клеток, генерирующих костную ткань, и активаторы макрофагов, отвечающих за процессы ранозаживления и восстановления окружающих тканей.

Необходимость ковалентного связывания этих веществ с полимером определяет выбор полимеров-носителей, их химические и биологические свойства. Диальдегидполисахариды весьма часто используются в качестве носителей водорастворимых лекарственных средств, однако их использование в качестве основы биоразлагаемых имплантатов исследовано слабо. Они удобны для присоединения физиологически активных пептидов за счет образования альдеминной связи между аминокетонами белка и альдегидными группами носителя. Этот тип связи легко гидролизуется в организме даже без участия ферментов с постепенным выделением в кровоток физиологически активного пептида.

В настоящей работе производные декстрана использовали в качестве носителя белка коллагена, являющегося моделью микробных морфогенетических белков (ММР), активирующих активность остеобластов костной ткани. Декстран является полностью инертным полимером, поэтому в качестве носителя-активатора макрофагов, использовали диальдегидкарбоксиметилцеллюлозу. Дополнительно к полимеру присоединяли известный стимулятор ранозаживления – инсулин.

Важнейшей характеристикой физиологически активных полимеров, используемых в контакте с кровотоком, является их химическое строение, молекулярно-массовое распределение, а также фракционная однородность, от которых в значительной степени зависит безопасность применения имплантатов. Поэтому настоящая работа посвящена синтезу и исследованию основных свойств диальдегиддекстрана и диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы.

Цель и задачи диссертационной работы:

- синтез физиологически активных полимеров, содержащих инсулин и коллаген, с использованием диальдегиддекстрана и диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы в качестве полимеров носителей и оценка их остеокондуктивных свойств и скорости биodeградации в опытах *in vitro* и *in vivo*;
- синтез диальдегидполисахаридов различных степеней окисления на основе декстрана и карбоксиметилцеллюлозы;
- изучение влияния периодатного окисления на молекулярно-массовые характеристики образующихся полимеров;
- изучение химической структуры окисленных звеньев полимеров;
- получение композиционных костнозамещающих материалов с регулируемой скоростью биodeградации на основе полученных полимеров, содержащих наногидроксиапатит и другие добавки.

Научная новизна:

- получены новые полностью синтетические композиты на основе диальдегиддекстрана и диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы, содержащие физиологически активные полимеры, наполнитель-наногидроксиапатит, и замедлители скорости биodeградации фосфазенового типа, антибиотик;
- обнаружено резко замедленное окисление карбоксиметилцеллюлозы, по сравнению с декстраном;
- показано, что молекулярная масса полимеров 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 (ВМП);

– найдены условия получения фракционно-однородных полимеров – продуктов ковалентно связанного инсулина с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой;

– установлен эффект замедления скорости биodeградации коллагена.

Теоретическая и практическая значимость 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, гель-проникающая хроматография, атомно-силовая микроскопия, обратное йодометрическое титрование, методы исследования скорости биodeградации *in vitro* и *in vivo*, метод исследования osteoкондуктивных 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 остеокондуктивных свойств и скорости биодеградации костнозамещающих композитов, полученных на основе полисахаридных физиологически активных полимеров.

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).

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Полисахариды, применяемые в качестве полимеров-носителей биологически активных веществ

Полисахариды представляют собой длинные цепи, образованные сотнями или тысячами моносахаридных единиц. В природе большинство углеводов представлено в виде полисахаридов с высокой молекулярной массой. Биологическое значение ряда полисахаридов состоит в том, что они обеспечивают накопление моносахаридов, другие же служат структурными элементами клеточных стенок и соединительной ткани [1].

Полисахариды, называемые также гликанами, отличаются друг от друга, как природой составляющих их моносахаридных остатков, так и длиной и степенью разветвленности цепей. Их можно разделить на 2 типа: гомополисахариды (гомогликаны), состоящие из остатков одного и того же моносахарида, и гетерополисахариды (гетерогликаны), содержащие остатки двух или большего числа моносахаридов. Оба полимера могут быть линейными или разветвленными. Пример гомополисахарида – резервный углевод крахмал, состоящий из остатков только D-глюкозы. Примером гетерополисахарида может служить содержащаяся в соединительной ткани гиалуроновая кислота, которая состоит из чередующихся остатков двух разных моносахаридов. Полисахариды нельзя характеризовать строго определенной молекулярной массой: как правило, они представлены смесями высокомолекулярных соединений; в зависимости от метаболических потребностей клеток моносахаридные остатки могут ферментативно присоединяться к полисахаридам или же отщепляться от них [2].

Полисахариды – широко распространенная группа полимеров, применяемых в качестве носителей для различных классов лекарственных веществ (физиологически активных соединений). В настоящее время существует большое количество полимеров-носителей физиологически активных соединений, но далеко не все из них удовлетворяют жестким

требованиям, которые предъявляются к материалам находящимся длительное время в непосредственном контакте с кровью в организме человека [3-6]. Среди полимерных носителей особый интерес представляют полисахариды и другие биodeградирующие полимеры природного происхождения [7].

1.1.1 Декстран

Декстран – групповое название полисахаридов, получаемых методом микробиологического синтеза, основная молекулярная цепь которого состоит из ангидро-D-глюкопиранозных звеньев, соединенных преимущественно α -1,6-гликозидными связями (рисунок 1).

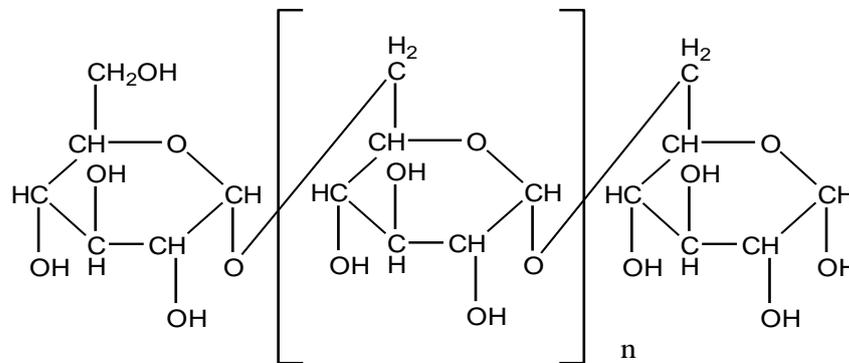


Рисунок 1 – Строение декстрана

Кроме α -1,6-гликозидных связей в макромолекулах разных препаратов декстрана может содержаться различное количество α -1,2-, α -1,3- или α -1,4-гликозидных связей, при помощи которых обычно осуществляется присоединение к основной цепи боковых цепей. Получены декстраны, молекулы которых являются практически неразветвленными, а элементарные звенья на 95% соединены α -1,6-гликозидными связями.

Широкую известность полисахарид декстран приобрел в связи с тем, что водные растворы некоторых препаратов этого полимера с молекулярным весом 35-70 тыс. и низкой степенью разветвленности являются эффективными заменителями плазмы крови. Преимущество декстрана перед карбоцепными полимерами (поливинилпирролидон, поливиниловый спирт), также применяющимися для этой цели, заключается в том, что декстран в отличие от карбоцепных полимеров постепенно гидролизуется в организме ферментами.

Это исключает возможность накопления полимера в органах макроорганизма. Очень важным оказалось использование декстрана в качестве исходного вещества при получении сефадексов, широко применяющихся в геле-хроматографии. Декстран и его производные находят все возрастающее применение и для других целей [8-12].

1.1.2 Диальдегиддекстран

Присоединение физиологически активных веществ, как правило, требует предварительной функционализации полимера-носителя. Одним из наиболее распространенных способов функционализации является периодатное окисление. Метод применяется для полисахаридов, имеющих в составе звена vicinalные гидроксильные группы [13, 14]. К таким носителям относится декстран.

Основными направлениями развития химии декстрана за последнее десятилетие является расширение числа окислителей, применяемых для получения карбонилсодержащих производных декстрана, и синтез на основе продуктов окисления декстрана его новых производных [15].

Диальдегиддекстраны получают методом окисления соответствующих полисахаридов в водном растворе йодной кислотой или ее солями. Полное окисление декстрана йодной кислотой наряду с другими методами давно используется для изучения строения макромолекул декстрана. Чаще других используют либо гомофазное окисление периодатом натрия в водном растворе, либо гетерофазное окисление при пропускании раствора полисахарида через анионообменную смолу в IO_4^- форме. Гомофазное окисление предпочтительно для лабораторных условий. Оно позволяет легко контролировать степень окисления, изменяя соотношение реагентов. Гетерофазный метод чаще применим в заводских условиях, поскольку позволяет избежать стадии очистки продукта от солей и остаточных количеств периодата [16-18].

Полученный диальдегиддекстран обладает комплексом уникальных свойств, которые предопределили его широкое использование в качестве полимера-носителя различных лекарственных средств (физиологически активных веществ) (рисунок 2). Химическое строение и свойства окисленного звена предопределяют дальнейшее поведение носителя после введения в организм. В частности, не исключено, что диальдегиддекстран не является инертным носителем, и способен образовывать ковалентные химические соединения с белками крови [13, 19-21].

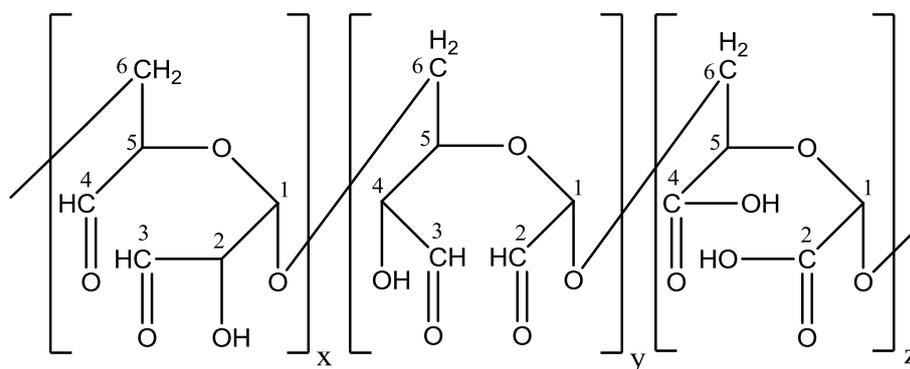


Рисунок 2 – Строение диальдегиддекстрана

1.1.3 Карбоксиметилцеллюлоза

Особое место среди полимерных носителей природного происхождения занимает целлюлоза, которая является одним из наиболее распространенных биополимеров, а ее производные обладают уникальным комплексом свойств, включающим биосовместимость, биоразлагаемость и невысокую стоимость [22].

Для придания водорастворимости целлюлозу подвергают химической модификации [14]. Наиболее распространенной является карбоксиметилирование по 6-му положению ангидроглюкозного звена с образованием карбоксиметилцеллюлозы (рисунок 3). Модификация более 70 % ангидроглюкозных звеньев позволяет получать водорастворимый полимер, который широко используется как в медицине, так и в пищевой промышленности. Карбоксиметилцеллюлоза сама по себе не является «удобным» носителем физиологически-активных соединений и требует

дальнейшей химической модификации для получения более реакционно-способных производных. Чаще других используется периодатное окисление с образованием диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы [23-26].

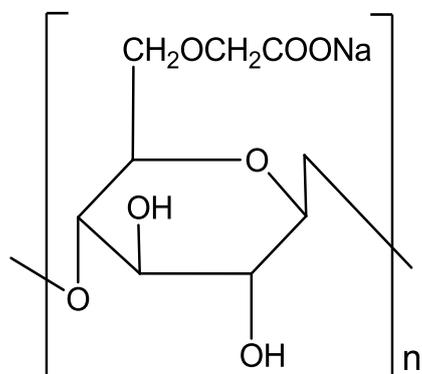


Рисунок 3 – Строение карбоксиметилцеллюлозы

1.1.4 Диальдегидкарбоксиметилцеллюлоза

Диальдегидкарбоксиметилцеллюлозу получают методом периодатного окисления карбоксиметилцеллюлозы (схема 1) [12, 27-29].

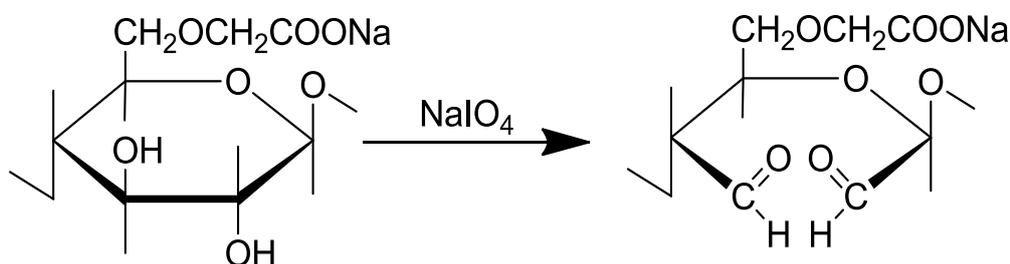


Схема 1

Окисленную форму карбоксиметилцеллюлозы широко используют в качестве полимера-носителя лекарственных средств. Диальдегидкарбоксиметилцеллюлоза – хорошо известный полусинтетический биodeградирующий полисахаридный носитель физиологически активных соединений. Она инертна при пероральном применении и широко используется в фармакологии для синтеза полимерных лекарственных форм. При внутримышечном и внутривенном введении растворимые производные ДАКМЦ вызывают острый иммунный ответ, причем тем сильнее, чем ниже степень карбоксиметилирования и выше молекулярная масса полимера [30].

1.1.5 Применение полисахаридов в качестве веществ, замедляющих биодegradацию белков

Полисахариды – часто применяются как носители для различных классов природных веществ. Среди таких материалов в первую очередь следует упомянуть целлюлозу, крахмал, декстраны, агарозу, а также сшитые производные последних, например, такие, как сефадексы, сефакрил, некоторые типы сефароз. Все эти полимеры отличаются гидрофильностью или растворимостью в воде. Производные декстранов и агарозы образуют достаточно плотные гели, а носители на основе целлюлозы обладают высокой механической прочностью. Являясь полифункциональными высокомолекулярными соединениями, полисахариды достаточно легко образуют различные функциональные производные, способные реагировать с лигандами различного строения [31].

Общие требования к полимерам-носителям:

- полимер должен растворяться в воде;
- M_w и ММР полимера должны обеспечивать длительную циркуляцию, эндоцитоз, и, желательно, чтобы основная цепь была биодеструктурирующей;
 - Оптимально M_w 20-80 кДа для биодеструктурирующих и 30 кДа для небидеструктурирующих полимеров-носителей;
 - Носитель должен содержать функциональные группы для присоединения ФАВ;
 - Полимер должен быть биосовместим:
 - Не взаимодействовать с кровью;
 - Не быть токсичным;
 - Не быть антигенным.
 - Используют нейтральные, или активные полимеры: альбумин, гепарин, пирановый сополимер, поли-L-лизин;
 - Полимер должен быть доступен;

Прививка лекарственных средств на носитель позволяет:

- конструировать физиологически активные полимеры (ФАП) с заданной активностью;
- регулировать фармакокинетику;
- изменять длительность действия;
- изменять распределение в организме;
- замедлять скорость метаболизма.

1.1.6 Присоединение белков к окисленным полисахаридам

Чаще всего диальдегидполисахариды применяют для присоединения веществ, имеющих в своей структуре первичную аминогруппу, включая белки и физиологически активные пептиды. Результатом взаимодействия являются белково-полисахаридные конъюгаты, в которых белковые молекулы связаны с полисахаридом ковалентной связью (схема 2).

Возможны несколько вариантов связывания отличающиеся типом ковалентной связи. К ним относятся альдиминовая связь, пиримидиновые циклы, вторичная и третичная аминная - продукт реакции Майяра [32, 33].

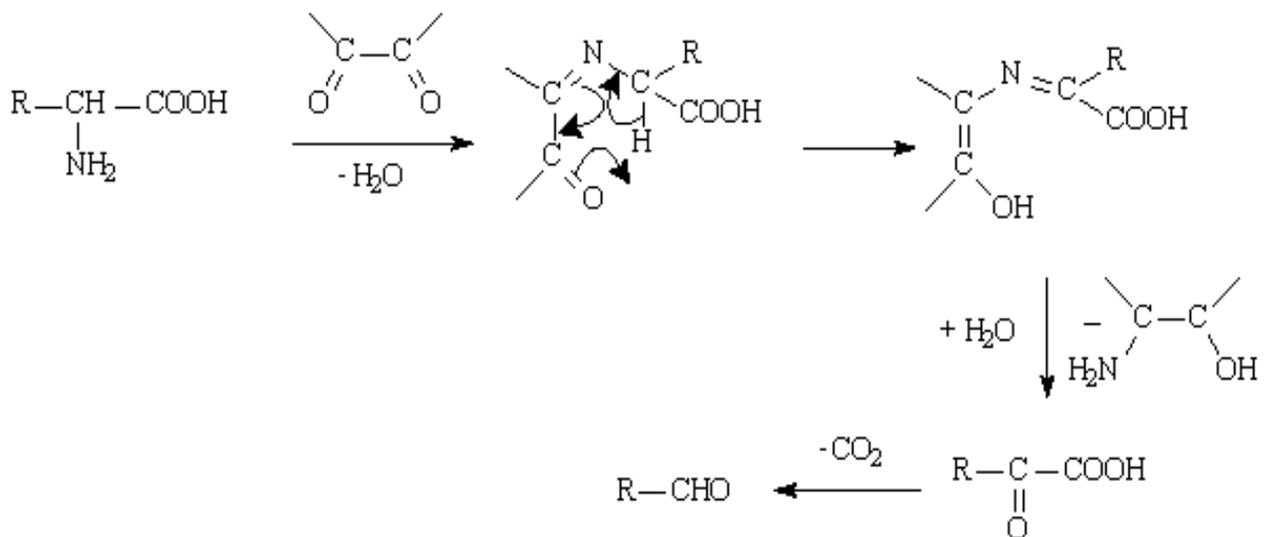


Схема 2

Прочность связывания белка с полисахаридом определяется гидролитической стабильностью связей и сильно различается от легкогидролизуемой альдиминовой до практически не гидролизуемой в условиях организма вторичной аминной. Тип образовавшейся связи зависит как от условий получения диальдегидполисахарида, так и от формирования конъюгата, и до настоящего времени является предметом острых дискуссий. Знание природы и реакционной способности окисленных звеньев диальдегидполисахаридов, полученных различными способами, чрезвычайно важно. Непрореагировавшие с белком звенья входят в состав белково-полисахаридного конъюгата. Они неотделимы от последнего, и звенья оказываются в крови вместе с полимерным лекарством. Альдегидные группы остаются частью полимера-носителя и при этом сохраняют свою реакционную способность. Таким образом, полимерное лекарство в целом оказывается реакционноспособным полимером, способным связываться с белками крови [34]. Для инактивирования носителя используют восстановление остаточных альдегидных групп до инертных спиртовых боргидридом натрия. Альдиминовая связь при этом восстанавливается до вторичной аминной, однако образующийся полимер с разомкнутыми гликозидными циклами существенно менее устойчив к гидролизу.

1.2 Композиционные материалы: состав и свойства

Композиты (композиционные материалы) – это многокомпонентные материалы, состоящие из полимерной, металлической, углеродной, керамической или другой основы (матрицы), армированной наполнителями из волокон, нитевидных кристаллов, тонкодисперсных частиц и др. Композитные материалы – это смесь двух фаз или более, связанных вместе так, что передача напряжения происходит по их границе. Композиционные материалы создают для того, чтобы обеспечивать сочетание свойств, которые не могут быть достигнуты с помощью материала, имеющего одну фазу.

Композиционные материалы состоят, как правило, из пластичной основы (матрицы), армированной наполнителями, обладающими высокой прочностью, жесткостью и т. д. Сочетание разнородных веществ приводит к созданию нового материала, свойства которого количественно и качественно отличаются от свойств каждого из его составляющих. Варьируя состав матрицы и наполнителя, их соотношение, ориентацию наполнителя, получают широкий спектр материалов с требуемым набором свойств. Многие композиты превосходят традиционные материалы по своим механическим свойствам, но в то же время они легче. Использование композитов обычно позволяет уменьшить массу при сохранении или улучшении ее механических характеристик.

Путем подбора состава и свойств наполнителя и матрицы (связующего), их соотношения, ориентации наполнителя можно получить материалы с требуемым сочетанием эксплуатационных и технологических свойств. Матрица в композиционных материалах обеспечивает монолитность материала, передачу и распределение напряжения в наполнителе, определяет тепло-, влаго-, огне- и химическую стойкость. По природе матричного материала различают полимерные, металлические, углеродные, керамические и другие композиты [35].

Композиты, в которых матрицей служит полимерный материал, являются одним из самых многочисленных и разнообразных видов материалов, применяемых в медицине.

Например, естественная кость, состоящая из коллагена и гидроксиапатита, является примером идеального сложного композиционного материала. Фибриллы коллагена, имеющего низкий модуль упругости, ориентированы в кости таким образом, что их прочные первичные связи параллельны приложенным напряжениям. Высокий модуль упругости минерала кости ГА обеспечивает жесткость, а прямая химическая связь между двумя фазами обеспечивает необходимую передачу напряжений [36].

1.2.1 Композиционные материалы и соединения, применяемые в имплантации при замещении кости

Традиционно в имплантации используются различные биологические объекты, обработанные тем или иным способом, например, донорская кость. Но их применению в некоторых случаях препятствует ряд факторов, таких как риск вирусной инфекции, форма кости, совместимость донорской кости и реципиента.

Помимо биологических объектов в современной имплантации для костного эндопротезирования применяются металлы и сплавы, пористые материалы на их основе, силикатные материалы и другие. Но они обладают рядом недостатков: например, значительно отличаются по механическим свойствам от биологического материала, что при многократных циклических нагрузках может привести к разрушению кости. Кроме того, такие материалы достаточно тяжелы. В качестве металлических имплантатов используют титан, сплавы кобальта и хрома, молибдена и хрома, титана и циркония. Среди металлических имплантатов широкое распространение получили титановые имплантаты, покрытые оксидной пленкой на поверхности, которая снижает реактивные изменения в тканях на границе с имплантатом [37, 38].

Среди силикатных материалов наибольшее распространение получила «биокерамика», основой которой является гидроксиапатит, который способен совмещаться с живой тканью. Широко используется алюмооксидная керамика, отличающаяся от других силикатных материалов более высокой прочностью, биологической инертностью и рентгеноконтрастностью. Но в то же время изделия из керамики отличаются повышенной хрупкостью и применимы для протезирования костей преимущественно малых размеров, работающих при относительно небольших нагрузках.

По составу и основным медико-техническим характеристикам имплантаты для замещения костей подразделяются на следующие основные категории:

- 1 Имплантаты на основе биоматериалов - «Биоимплантаты»:
 - Аллогенные имплантаты из трупной ткани человека;
 - Ксеногенные имплантаты из материалов животного происхождения (например: бычья кость);
- 2 Имплантаты из материалов природного происхождения:
 - Имплантаты на основе коллагена разных типов;
 - Имплантаты на основе белков других типов (шелковый фиброид);
 - Имплантаты на основе небелковых материалов (полисахариды);
- 3 Имплантаты на основе синтетических материалов:
 - На основе синтетических полимеров:
 - Полигликолидлактидные;
 - Полицианакрилатные;
 - Акрилатные;
 - Фосфазенсодержащие;
 - Фрагментированные полиуретановые;
 - Синтетические керамические, в том числе трехмерные керамические;
 - Синтетические кальций фосфатные цементы;
 - Биостекло;
- 4 Биокompозитные, содержащие компоненты различного происхождения в разных сочетаниях;
- 5 Наноразмерные-биокompозитные имплантаты, содержащие неорганические компоненты наноразмеров (например, наногидроксиапатит).

Несмотря на кажущее изобилие, в практической медицине наибольшее распространение получили только два вида материалов: это инертные металлы и сплавы для высоконагруженных деталей и биоразлагаемые имплантаты для всех остальных случаев [38].

1.2.2 Требования к композитам, применяемым для замещения кости

По современным представлениям «идеальный» костнозамещающий материал должен обладать целым рядом специфических свойств, наиболее

важными из которых являются остеоиндуктивность, биодegradация и способность нести функцию конкретной костной ткани.

Остеоиндуктивность - это способность имплантата индуцировать пролиферацию (рост) и дифференцировку клеток в остеобласты (клетки костной ткани). Методом испытаний на остеоиндуктивность является тест на культуре клеток, заключающийся в оценке способности имплантата вызывать пролиферацию стволовых мезенхимальных клеток и их последующую дифференциацию в остеобласты. В настоящее время остеоиндуктивностью обладают только те имплантаты, которые содержат белковые индукторы остеогенеза как нативные (тромбоцитарная масса, деминерализованная кость), так и рекомбинантные белки BMP-2, BMP-7 на полимерных носителях [39].

Оптимальное значение остеоиндуктивности определяется скоростью регенерации костной ткани больного, причем, чем выше естественная скорость регенерации костной ткани, тем меньшая остеоиндуктивность требуется от имплантата. Превышение остеоиндукции вызывает осложнения.

Остеокондуктивность – это способность имплантата играть роль матрицы (опоры) для роста новой костной ткани. Методом испытаний на остеокондуктивность является тест на культуре клеток, заключающийся в оценке способности уже дифференцированных остеобластов к пролиферации на поверхности и в объеме имплантата. Особенно важную роль играет пористость имплантата. Установлено, что поры должны быть сообщающимися (незамкнутыми) и распределение пор по размерам должно быть бимодальным. Имплантаты, содержащие как макро, так и микропоры, обладают лучшей остеокондуктивностью. При этом через макропоры происходит васкуляризация новой костной ткани. Оптимальным является размер пор 450 мкм. В отличие от остеоиндуктивности, которая имеет оптимальное значение, превышение которого нежелательно, чем выше остеокондуктивность, тем выше эффективность имплантата.

Базовым требованием к имплантату является его способность нести

функцию утраченной костной ткани. Нагрузки на имплантат могут колебаться в самых широких пределах и единых требований к механическим свойствам не существует. Требования специфичны для каждого вида имплантата.

Основными физико-механическими параметрами имплантата являются:

- 1 Модуль Юнга при нулевой деформации;
- 2 Предел прочности при растяжении;
- 3 Относительное удлинение при разрыве;
- 4 Прочность при 10% деформации при сжатии. Удельная ударная вязкость;
- 5 Скорость отверждения для клеев и вяжущих материалов;
- 6 Адгезионная прочность (для клеев).

В качестве параметров, определяющих безопасность имплантата, используются следующие обязательные тесты:

1. Канцерогенность;
2. Тератогенность;
3. Апирогенность;
4. Стерильность;
5. Острая токсичность;
6. Хроническая токсичность;
7. Мутагенность.

А так же дополнительные тесты:

8. Антигенность;
9. История имплантата (карта болезней донора) для имплантатов алогенного происхождения;
10. Степень сшивки коллагена, возраст животного для имплантатов ксеногенного происхождения;
11. Степень риска прионного заражения для имплантатов ксеногенного происхождения.

В реальных имплантатах не удается удовлетворить всем требованиям в полной мере, поэтому работы в этой области сохраняют свою актуальность.

Большинство параметров изменяется со временем при биоразложении материала, поэтому весьма важно уметь прогнозировать и управлять скоростью изменения этих параметров при биологическом старении и деградации в организме, что определяет, в конечном счете, качество имплантатов, их устойчивость в организме, долговечность и скорость замещения собственной костной тканью [38, 40].

1.2.3 Коллаген – белок соединительной ткани

Одним из самых распространенных в медицине природным полимерным материалом является коллаген. Все многоклеточные организмы содержат коллаген, представляющий собой семейство фибриллярных белков. Коллаген является основным фибриллярным элементом кожи, костей, сухожилий, хряща, кровеносных сосудов, зубов. Он составляет от 25 до 33% общего количества белка и, следовательно, около 6% массы тела [40-42]. В том или ином количестве он содержится почти во всех органах, и именно он объединяет клетки в определенные структурные единицы. Помимо этой «структурной роли» в сформированных тканях коллаген играет организующую роль в развивающихся тканях. Отличительным свойством коллагена является его способность к формированию нерастворимых фибрилл, обладающих высокой упругостью. Более того, структура коллагеновых волокон зависит от типа ткани и соответствует ее специализации [44, 45].

Состав коллагена уникален. В отличие от кератина он содержит очень много глицина 33% мольных, 3- и 4-оксипролина 21%, на долю аланина приходится 11%, дисульфидных мостиков менее 3 мольных % [46]. В молекуле коллагена примерно 1/3 аминокислотных остатков приходится на глицин, что необычайно много для белков. Количество пролина в коллагене также значительно выше, чем в большинстве других белков. Наконец, в коллагене

имеются две аминокислоты, крайне редко встречающиеся в других белках, а именно гидроксипролин (рисунок 4) и гидроксизин (рисунок 5).

Последовательности аминокислотных остатков в коллагене свойственна высокая степень регулярности: почти каждый третий остаток – это глицин; часто повторяются участки глицин-пролин-гидроксипролин. В этом отношении коллаген отличается от глобулярных белков, которым не свойственна регулярность последовательности аминокислот; помимо коллагена этим свойством обладают фиброин шелка и эластин [47].

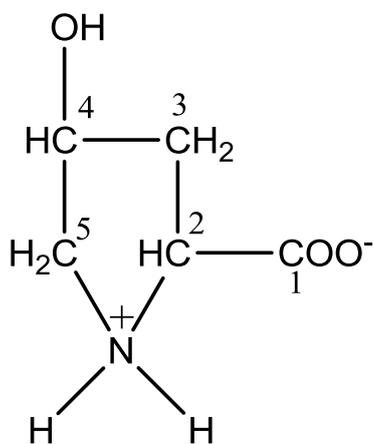


Рисунок 4 – 4-гидроксипролин (Hyp)

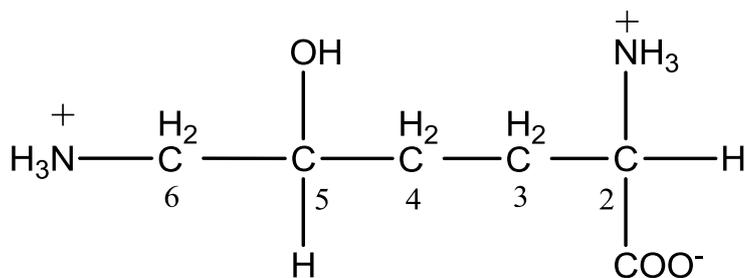


Рисунок 5 – 4-гидроксизин (Hyl)

В настоящее время выделено 27 типов коллагена [46], из них 21 охарактеризованы в деталях и разделены на 8 групп, которые отличаются друг от друга по первичной структуре пептидных цепей, функциям и локализации в организме. Тип I коллагена преобладает у высших животных.

Нерастворимость коллагена на протяжении многих лет служила препятствием для изучения его химических свойств. Положение изменилось, когда обнаружили, что коллаген из тканей молодых животных можно

экстрагировать в растворенном виде, поскольку на этом этапе в его структуре относительно мало поперечных связей. Отсутствие ковалентных поперечных связей в незрелом коллагене позволяет выделить основную структурную единицу – тропоколлаген [46, 48]. Молекулярная масса тропоколлагена 285 кДа, состоит он из трех полипептидных цепей одинакового размера. Состав цепей зависит от типа коллагена.

Коллаген обладает рядом уникальных свойств: он обладает биологической активностью, стимулирует регенерацию поврежденной ткани. Экзогенный коллаген резорбируется в организме, при этом время резорбции можно регулировать. Кроме того наряду с вышеперечисленными свойствами, он обладает низкой антигенной активностью по сравнению с другими белками [47].

1.2.4 Биодegradация коллагена и препаратов на его основе

В общем случае можно выделить четыре стадии биодegradации:

1. Гидратация;
2. Потеря механической прочности;
3. Потеря целостности;
4. Потеря массы.

Критической стадией является гидратация. Биодegradация связана со свойствами полимера, такими как тип химической связи, кристалличность полимера, молекулярная масса и способностью поглощать воду и также с факторами окружающей его среды, например - pH. Механизмы дegradации полимера были классифицированы несколькими учеными. Геллер [13] выделил 3 механизма дegradации. Первый - относится к водорастворимым полимерам, в которых создают поперечные сшивки, в результате чего полимер может лишь набухать до определенной степени, которая обусловлена поперечными связями. Этот механизм может быть разделен на два подтипа. В первом подтипе (а)

происходит расщепление поперечных связей, во втором (b) происходит расщепление основной полимерной цепи (рисунок 6).

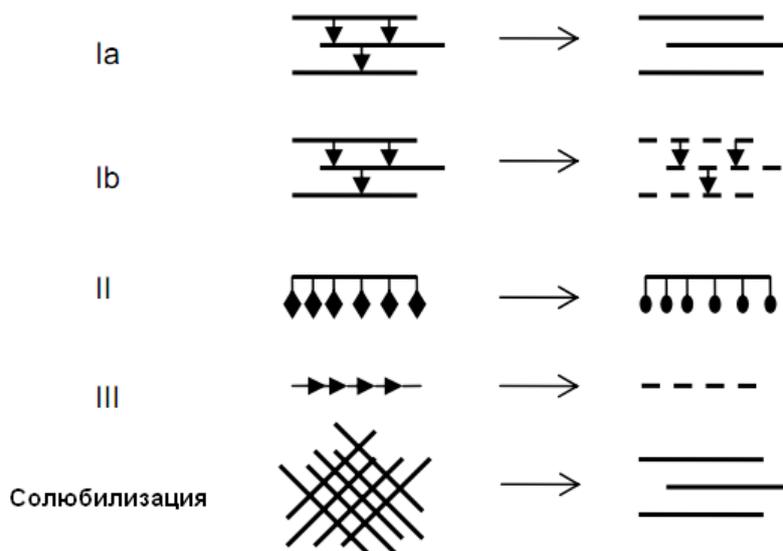


Рисунок 6 – Механизмы деградации полимеров

Подтип Ia приводит к образованию фрагментов, которые могут подвергаться дальнейшей деградации, в то время как расщепление полимера по механизму Ib приводит к образованию продуктов относительно небольшой молекулярной массы. Нерастворимые в воде полимеры, подверженные деградации по механизму Ib, после любого химического или ферментативного расщепления образуют низкомолекулярные продукты, растворимые в воде. Поперечно сшитый коллаген или желатин деградирует по этому механизму.

Биодеградация коллагена *in vitro* протекает в водных условиях под действием фермента, который проникает в молекулу и расщепляет связи. Быстрее всего нативный коллаген может быть расщеплен при помощи коллагеназ. Эти ферменты способны расщеплять неденатурированный коллаген при физиологическом значении температуры и pH [46]. Если эти условия соблюдены, то коллагеназа расщепляет сразу все три цепи коллагена. Неспецифические протеиназы, такие как пепсин, могут атаковать лишь телопептиды или денатурированные спиралевидные участки коллагена [47-49].

Таким образом, эти ферменты ответственны за дальнейшую биodeградацию коллагена до аминокислот.

Известно два типа коллагеназ:

1. Коллагеназы, синтезируемые микроорганизмами, например, *Clostridium histolyticum* (СНС);
2. Тканевые коллагеназы, обнаруживаемые у земноводных и млекопитающих в растущих и подвергающихся метаморфозу тканях, например в хвостовом плавнике головастика.

Для экспериментов *in vitro* часто используют коллагеназу, выделенную из СНС – бактерии, вызывающей газовую гангрену [48]. Это связано с тем, что этот фермент раньше был единственным доступным и очищенным в достаточной степени для проведения опыта, а так же из-за его низкой стоимости по сравнению с другими тканевыми коллагеназами. Более того, фермент, выделенный из СНС, легче в использовании по сравнению с тканевыми коллагеназами, т.к. не требует дополнительной стадии активации и имеет более широкий спектр «переваривания». Эта коллагеназа расщепляет все типы коллагенов без предпочтения в определенном типе коллагена, а так же, несмотря на различные сайты (позиции) расщепления, их специфичность весьма похожа на человеческую нейтрофильную и на фибробластовую коллагеназу, что очень важно для корреляции экспериментов *in vivo-in vitro*. Расщепление происходит по связи Y-Gly в спиральной последовательности -P-Y-Gly-P- с неполярными областями, где P либо пролин, либо гидроксипролин, Y – другая аминокислота. В зависимости от типа коллагена может быть расщеплено около 150-200 связей в цепи.

В настоящее время известно 7 форм *Clostridium histolyticum* и все они содержат цинк, кальций и состоят из одной полипептидной цепи с одним активным центром. Атом цинка расположен в активном центре и, таким образом, является неотъемлемой частью катализа, в то время как атомы кальция необходимы для стабилизации конформации фермента и

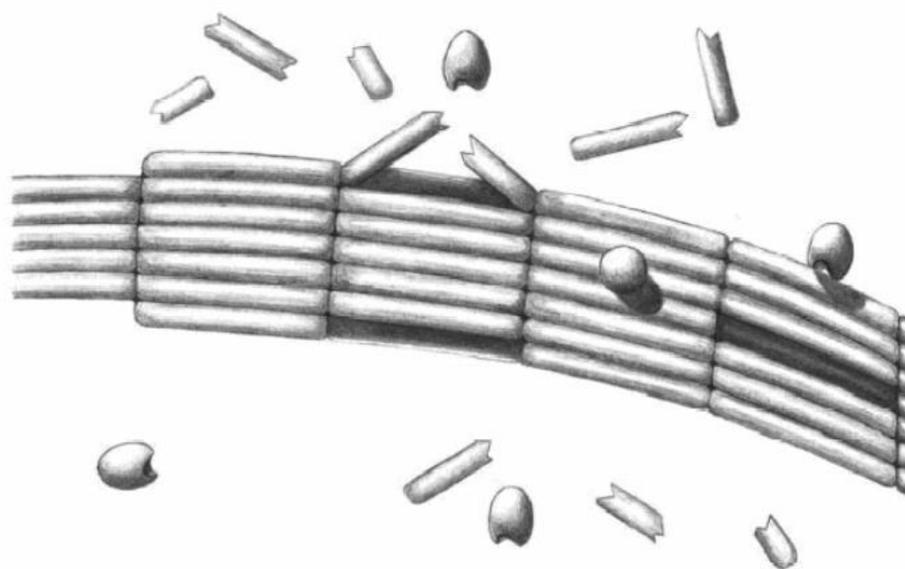


Рисунок 8 – Механизм действия бактериальной коллагеназы

Если коллагеназа связывается с коллагеном, то затем происходит взаимодействие ионов кальция с остатками коллагена, при этом изменяется конформация фермента и соседние позиции с атомом цинка становятся доступными для связывания с аминокислотами коллагена. Благодаря типичной спиралевидной форме коллагена, расщепление последовательности -P-Y-Gly-P приводит к образованию «кармана», в котором Y и глицин будут находиться на конце. Считается, что атом цинка активного центра образует связь с глицином и в результате этого происходит расщепление. Фиелдс [47] и соавторы обнаружили, что участок для связывания с тканевыми коллагеназами обогащен иминокислотами, а это, в свою очередь, приводит к образованию плотной и термически устойчивой области коллагена. Эта область следует за менее термически устойчивой винтовой частью, которая более подвижна благодаря меньшему содержанию иминокислот. Винтовая часть может быть легко деспирализована и фермент получает доступ к расщеплению. Дегградация под действием коллагеназ не приводит к образованию индивидуальных аминокислот. Последующее расщепление пептидов катализируется неспецифическими протеиназами.

Деградация коллагена *in vivo* более сложна, чем *in vitro*. В коллагенсодержащие имплантаты проникают различные возбужденные клетки такие как фибробласты, макрофаги и нейтрофилы, которые могут вызвать распад имплантата и выделение коллагена под действием выделяемых ими ферментов. Проникновение клеток в имплантат зависит от ряда свойств имплантата, таких как форма, пористость, степени сшивки, а также места имплантации и уровня ферментативной активности [48, 49].

«Слабым звеном» синтетических имплантатов для замещения костей, определяющим скорость биоразложения имплантата, в целом является коллагеновый матрикс. Под действием коллагеназы в организме он разлагается значительно быстрее минерального наполнителя. Скорость биоразложения костных имплантатов определяют *in vivo* по скорости растворения образца при подкожной имплантации крысе. Одно измерение требует 60 дневного эксперимента.

1.2.5 Композиционные материалы на основе коллагена и гидроксиапатита

Композиционные материалы или композиты – вещества, образованные сочетанием химически разнородных компонентов с четкой границей раздела фаз. Сочетание разнородных веществ в композите дает эффект равносильно созданию нового материала, свойства которого качественно и количественно отличаются от свойств каждого из компонентов. Обычно композиционные материалы состоят из пластичной основы (матрицы) и наполнителя - включений компонентов в виде частиц любой формы [38, 50].

Свойства композитов определяются не только составом, но и взаимным расположением и размерами частиц различных фаз, прочностью связей на границе раздела фаз.

На сегодняшний день имплантаты, изготовленные из чистых фосфатов кальция, ограниченно применяют в медицине: во-первых, они слишком

хрупкие, а во-вторых, из них трудно изготовить изделия заданной формы. Более перспективными считаются композиты, основанные на полимерной матрице с наполнителем из гидроксиапатита или биостекла [50, 51].

Использование биodeградируемых полимеров в качестве матрицы является основным подходом в разработке композитов, обеспечивающих прорастание костной ткани в имплантат при деградации матрицы. Биоразлагаемые матрицы действуют как связка для предотвращения миграции частиц гидроксиапатита из места имплантации. В качестве органической фазы часто используют коллаген [51].

Композиционные материалы на основе гидроксиапатита и бычьего коллагена первого типа используются в клинической практике, как за рубежом, так и в России (Колаост, Гапкол, Колапол, КоллапАн) [50, 52]. Недостатками материалов этого типа являются часто возникающая аллергическая реакция, связанная с трудностью стерилизации коллагена, а так же отсутствие у этих материалов какой-либо способности стимулировать ранозаживление и рост костной ткани. Однако это не препятствует их широкому применению для замещения костных дефектов в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

1.2.6 Инсулин – гормон, стимулирующий ранозаживление

Инсулин является небольшим глобулярным белком с известной последовательностью аминокислот ($M_w=5,7$ кДа) и установленной пространственной структурой. Инсулин был открыт как фактор из поджелудочной железы, который может уменьшать гипергликемию у собак с удаленной поджелудочной железой и у человека при диабете.

Молекула инсулина образована двумя полипептидными цепями, содержащими 51 аминокислотный остаток: А-цепь состоит из 21 аминокислотного остатка, В-цепь образована 30 аминокислотными остатками. Полипептидные цепи соединяются двумя дисульфидными мостиками через

остатки цистеина, третья дисульфидная связь расположена в А-цепи. В растворе он легко ассоциирует, образуя изоэлектрические димеры, а в определенных условиях и более крупные олигомеры.

Первичная структура инсулина у разных биологических видов несколько различается, как различается и его важность в регуляции обмена углеводов. Наиболее близким к человеческому является инсулин свиньи, который различается с ним всего одним аминокислотным остатком: в 30 положении В-цепи свиного инсулина расположен аланин, а в инсулине человека — треонин; бычий инсулин отличается тремя аминокислотными остатками.

Исторически влияние инсулина на метаболизм углеводов привлекало наибольшее внимание. Этот гормон получил название гипогликемического фактора. Но он так же влияет на ряд других процессов, не связанных с утилизацией глюкозы. Инсулин оказывает влияние на ряд клеток, например, на фибробласты и лимфоциты и стимулирует ранозаживление синергично с другими гормонами [53-55].

1.2.7 Фосфазены и их применение, в качестве веществ, замедляющих биодegradацию белков, и носителей лекарственных средств

Полифосфазены – это циклические или линейные соединения, содержащие в молекулярном скелете чередующиеся атомы фосфора и азота. К ним относятся 3 важные группы веществ: цикло- и полифосфазены (фосфонитрилы), монофосфазены (фосфинимины) и фосфазаны [56]. Каждый атом фосфора в скелете может быть замещен двумя органическими боковыми группами, что определяет значительную широту свойств полимера. Широта возможностей синтеза, связанная с обширным рядом физических и химических свойств, является уникальной особенностью этого класса полимеров. К настоящему времени известен ряд различных полифосфазенов как небiorазлагаемых, так и бiorазлагаемых для биомедицинского применения (схема 3).

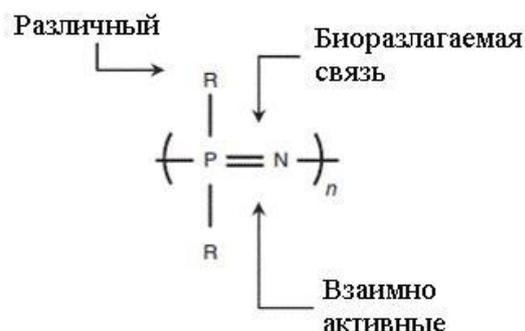


Схема 3. Полифосфазены

Следующие особенности отличают полифосфазены от других классов биомедицинских полимеров:

- Неорганическая цепь, способная к гидролитическому разложению, которое может быть осуществлено путем выбора соответствующих боковых групп;
- Уникальный способ синтеза этих полимеров, *макромолекулярное замещение*, позволяет ввести широчайший спектр заместителей методами простого органического синтеза;
- Подобные методы позволяют получать их высокопроизводительными синтезами, которые ускоряют процесс исследования;
- Уникальная гибкость основной цепи и ее способность участвовать в нековалентном связывании и образовании надмолекулярных структур создает новые возможности для связывания с биологическими системами.

1.2.8 Биоразлагаемые полифосфазены

Полифосфазены с гидролитически нестабильными боковыми группами, такими как сложные эфиры аминокислот, глюкозил, глицерол, лактид и сложные эфиры гликолидов образуют подкласс полимеров, известных как биоразлагаемые полифосфазены. Гидролитически чувствительные боковые

группы активируют основную цепь атомов азота и фосфора и разлагаются на различные побочные продукты, как показано на схеме 4.

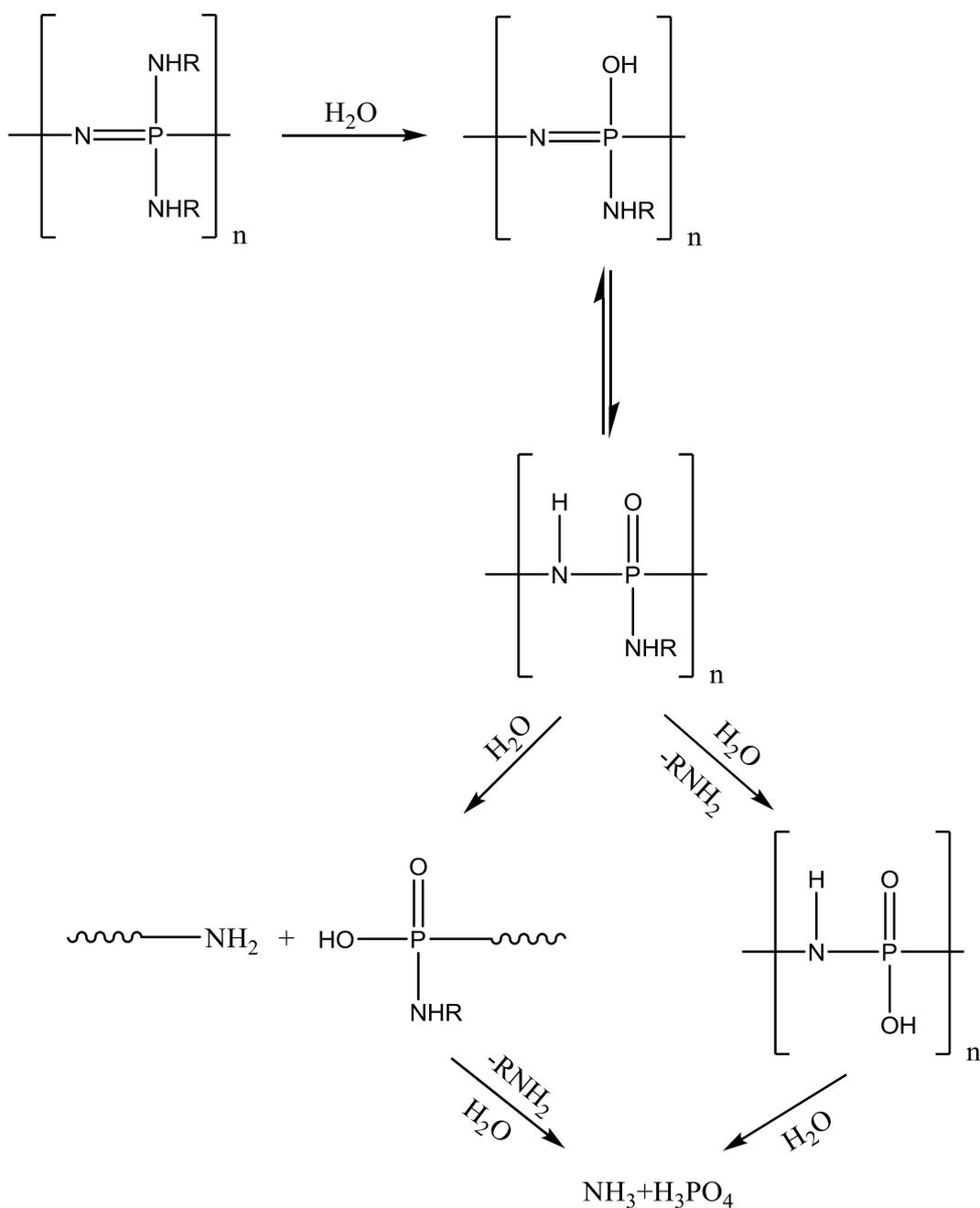


Схема 4. Общий способ разложения для полифосфазена с замещенными вторичными аминогруппами.

Разложение инициируется перегруппировкой боковых групп с участием гидроксил иона и протонированием атома азота в основной цепи, приводящее к фосфазен-фосфазановой перегруппировке. Также эти полимеры способны разлагаться посредством функционализации эфиров (здесь не указано). В обоих

случаях, полифосфазены образуют безвредные для организма продукты разложения (аминокислоты и фосфат-аммониевый буфер). Это обеспечивает улучшенную биосовместимость, и делает полифосфазены перспективными материалами в тканевой инженерии.

Скорость разложения полимера может варьироваться от нескольких часов до нескольких лет, и она зависит от боковых групп, выбранных для замещения атомов в боковой цепи. Различные комбинации боковых групп приводят к широкому интервалу времен разложения в ряду биоразлагаемых полифосфазенов, и физико-химические свойства соответствуют разнообразию применения фосфазенов в медицине [57].

Например, полифосфазены с замещенными вторичными аминогруппами используются как скаффолды (клеточные каркасы) для восстановления и регенерации ткани, в то время как биоразлагаемый полидикарбоксилатофеноксифосфазен до сих пор проходит клинические испытания в качестве полиэлектролитной иммуноадъювантной вакцины [58].

1.2.9 Цианакрилатные связующие

Полимеры цианакриловой кислоты и ее производных обладают уникальными свойствами. Они не мутагенны, не вызывают сенсibilизации. Способность цианакрилатов к полимеризации в считанные секунды в чрезвычайно мягких условиях на поверхности живой ткани без специального инициирования позволяет рассматривать их в качестве веществ для использования в хирургии [52]. Полицианакрилаты обеспечивают прочное и эластичное соединение тканей, проявляя при этом антисептические свойства без вредных последствий [59]. Рассматриваемый тип медицинских клеев используется при операциях на легких, мозге, сердце, почках, печени, органах пищеварения, зрения, дыхания, костной ткани и зубах [60-64].

Полицианакрилаты в силу своего химического строения являются единственным классом карбоцепных биodeградирующих полимеров.

Принципиально важно, что полицианакрилаты достаточно быстро разрушаются или биodeградируют в условиях живого организма [52]

Существует два механизма биodeградации полицианакрилатов в организме (рис. 6).

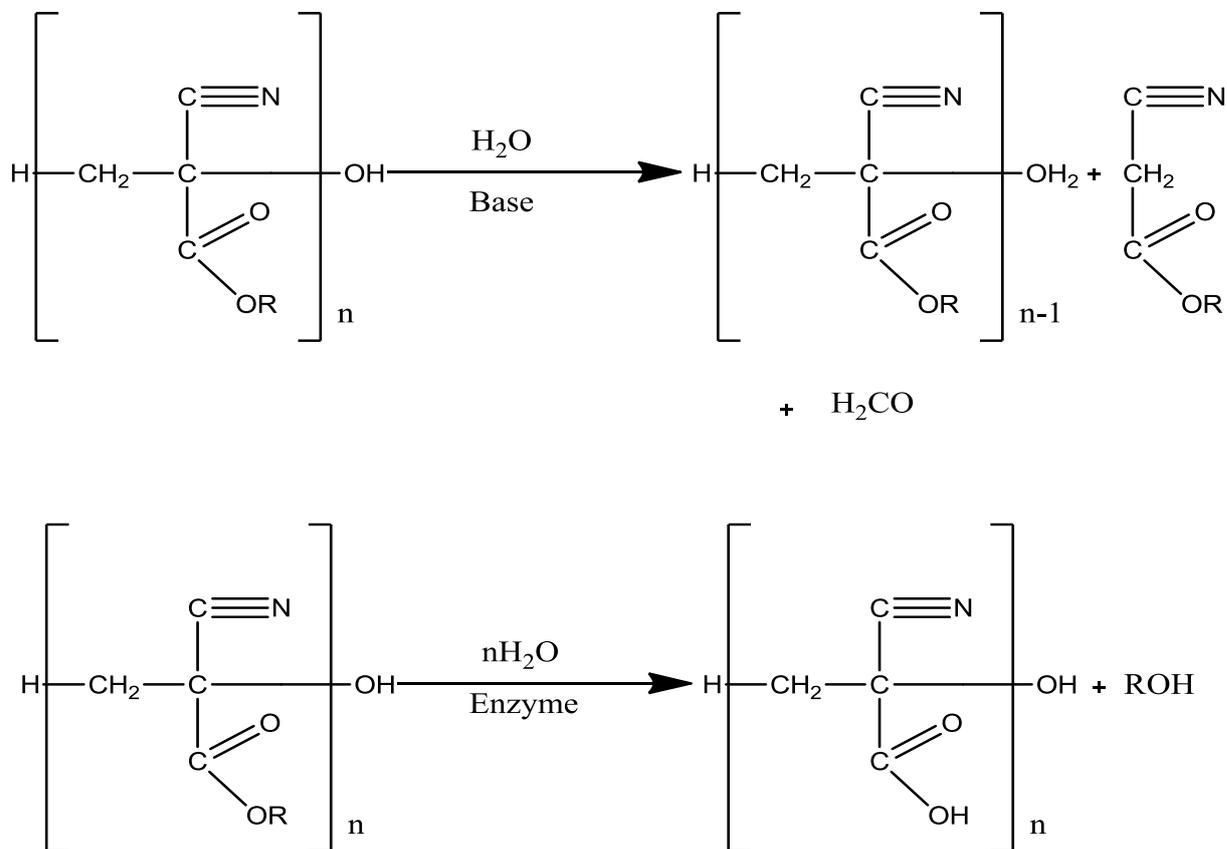


Рисунок 6. Механизмы биодеструкции полицианакрилатов

Первый механизм предусматривает расщепление основной цепи полимера под действием нуклеофила. В результате процесса выделяется формальдегид. Процесс начинается с концевой группы и его скорость сильно зависит от молекулярной массы и полидисперсности полимера [47].

Второй механизм предусматривает ферментативный гидролиз сложноэфирной связи с последующим декарбоксилированием образующихся фрагментов полицианакриловой кислоты. Гидролиз по этому механизму приводит к расщеплению молекулы в середине цепи по закону случая. Это приводит к резкому падению молекулярной массы.

Экспериментальным путем на примере полибутилцианакрилата и полигексилцианакрилата было показано, что с увеличением длины эфирного

радикала уменьшается скорость гидролиза, скорость выделения формальдегида и, соответственно, токсичность полимера [65-67].

Введение в эфирный радикал гидрофобных заместителей так же снижает скорость биodeградации полицианакрилата за счет снижения субстратной специфичности эфирного фрагмента. Наиболее эффективно ее можно регулировать введением сильно гидрофобных фторированных фрагментов [68-71].

1.2.10 Микроструктура носителя

Трехмерная структура оказывается жизненно важной для успешной реконструкции тканей. Хондроциты, прикрепленные к плоским поверхностям, когут распластываться, но приобретают фибробластоподобную морфологию, что указывает на изменения фенотипа и обратную дифференцировку. После этого клетки уже не обладают нужными механическими свойствами, и, более того, способность к регенерации поврежденного хряща у клеток, не имеющих истинного хондроцитарного фенотипа, существенно снижается. Поэтому для оптимизации роста жизнеподобных клеток требуется пористый трехмерный носитель [74].

Морфология и пористость – важные свойства носителя, которые нужно подгонять под регенерируемую ткань [75]. Было замечено, что для успешной регенерации определенных клеток требуются точные знания геометрических параметров.

Было обнаружено, что хондроциты легко прикреплялись, распластывались, и принимали форму фибробластов на пористых мембранах с размером микропор (0,2-1 мкм) [76].

Носитель должен выполнять роль устройства, на котором будет осуществляться доставка изолированных клеток, таких как хондроциты или их предшественники, в пустоты, образовавшиеся после извлечения неработающей ткани [77].

1.3 Строение костной ткани

Костная ткань состоит из клеток, заключенных в волокнистый костный матрикс остеоида (костеподобное вещество), который в основном (90%) представляет собой коллаген I типа в комплексе с неорганическими солями и содержит 10% аморфного вещества. Это главным образом глюкозаминогликаны (полисахариды) и гликопротеины. Остеоид занимает приблизительно 50% объема кости и 25% ее массы.

Костный матрикс можно весьма упрощенно представить как двухкомпонентный органо-неорганический гибрид, содержащий в качестве минерального компонента – карбонатгидроксиапатит, который скреплен органическим белковым компонентом – костным коллагеном [78,79].

В зависимости от вида и возраста кости соотношение органических и неорганических компонентов колеблется в широких диапазонах. Содержание органических веществ в кости тем больше, чем моложе кость. В связи с этим «молодые» кости отличаются гибкостью и мягкостью, а «старые» - хрупкостью и твердостью.

В процессе нормальной репарации кости в месте повреждения первым нарастает белковый матрикс- капсула с образованием слабо минерализованной ткани только после завершения построения коллагенового остеокондуктивного каркаса происходит ее минерализация с образованием кальций фосфатного белково-минерального гибрида. Образование первичной тканевой капсулы теснейшим образом связано с развитием воспаления и является стадией воспалительного процесса, через который проходит любой репаративный процесс восстановления кости. Кальцификация капсулы с ростом кости происходит медленно и значительно позже, уже после окончания процесса воспаления. Таким образом, процесс можно разделить на следующие основные стадии:

- Воспаление с привлечением в зону поражения соответствующих «нужных» клеток крови включая тромбоциты и тканевые макрофаги. Их

адгезия к поврежденной кости или к протезу с выделением в зону воспаления факторов роста и ранозаживления способствующих активации репаративных процессов.

- Активация восстановительных процессов, приводящая к образованию в зоне повреждения кости или вокруг протеза капсулы-«мозоли», сформированной из белкового матрикса обладающего остеокондуктивными свойствами. Механические свойства капсулы не позволяют воспринимать большие механические нагрузки и полноценно выполнять функцию кости, однако при определенных условиях она служит первичным матриксом остеокондуктором для закрепления и дифференциации остеобластов. Постепенно растворяясь, прорастая кровеносными сосудами (процесс васкуляризации) и, кальцифицируясь, мозоль превращается в полноценную кость. Белковая капсула может преобразоваться в костную, хрящевую и в другие виды соединительной ткани или вовсе рассосаться. Одним из условий ее преобразования именно в костную ткань является наличие на ее поверхности сигнальных маркеров – костных морфогенетических белков BMP [80, 81].

- Минерализация белкового матрикса с образованием органически неорганического гибрида на основе фосфат-карбоната кальция и коллагена заканчивающееся образованием полноценной кости. Этот медленный процесс является суммой активностей остеобластов – наращивающих кость и остеокластов – постоянно растворяющих, утилизирующих, кальций фосфат старой кости и возвращающих его остеокластам [81].

1.4 Регулирование скорости биодеградации

В организме любой имплантат подвергается воздействию агрессивных биологических сред и подвержен биоэрозии, которая протекает первоначально на поверхности, а затем и в блоке имплантата.

В зависимости от скорости биодеградации имплантаты подразделяются на следующие группы:

- Небиоразлагаемые;
- Биоразлагаемые с нерегулируемой скоростью биоразложения;
- Биоразлагаемые с регулируемой скоростью биоразложения.

Если имплантат предназначен для замещения утраченного фрагмента на длительный срок и относится к классу небиоразлагаемых, то биоэрозия является однозначно вредным фактором, приводящим к снижению прочности, биоинертности и других функциональных свойств имплантата. В этом случае, чем ниже скорость биодеградации имплантата, тем лучше. Скорость биодеградации должна быть столь низкой, чтобы запаса прочности имплантата было достаточно на весь срок его эксплуатации.

Основные сложности, возникающие при использовании небиодеградирующих имплантатов, связаны с постоянным механическим воздействием эндопротеза на окружающие ткани и проскальзыванием его в тканевой среде, что может вызвать затруднения в образовании нормальной тканевой капсулы, нарушении обменных процессов и некротические изменения [76,40].

Если необходимо временное функционирование имплантата и он относится к классу биодеградируемых, то для них скорость биоразложения является ключевым фактором. Процессы биоразложения имплантата и его замещения новой костной тканью должны быть строго синхронизированы. Это весьма непростая задача, особенно учитывая тот факт, что скорость регенерации костной ткани у разных больных может отличаться в несколько раз и зависит от возраста больного, его статуса (курит, не курит) и сопутствующих заболеваний (например, диабет). Если скорость биоразложения слишком высока и деградация опережает регенерацию, то имплантат может потерять прочность и целостность, сломаться и перестать выполнять свою функцию. Если скорость биодеградации слишком низкая, то это приводит к замедлению регенерации, а в ряде случаев к развитию фибросаркомы.

В последние годы активно ведутся исследования по биodeградируемым имплантатам, которые способны стимулировать рост новой костной ткани. Важную роль в стимуляции роста новой костной ткани играют костные морфогенетические белки BMP [77]. Полимерные лекарства, содержащие ковалентно-связанные морфогенетические белки BMP, позволяют создавать системы доставки с регулируемой скоростью выделения активного вещества непосредственно в область роста ткани. Введение таких систем в состав материалов для замещения костей позволяет создавать биокомпозиционные препараты с заданной и прогнозируемой остеоиндуктивностью [77, 36].

Одним из подходов регулирования скорости биodeградации коллагенсодержащих имплантатов является «маскирование» поверхности коллагена путем покрытия его слоем полисахарида или другого полимерного носителя, не являющегося субстратом для коллагеназы. Это резко снижает субстратную специфичность имплантата. Вероятно, гликозилирование поверхности коллагена является той самой причиной, по которой биоимплантаты, например, бычья деминерализованная кость, не подвержены быстрому биоразложению.

Настоящая работа посвящена получению биodeградирующих полностью синтетических полимерных композитов на основе ДАД и ДАКМЦ и предварительной оценки их эффективности в качестве костнозамещающих материалов для использования в восстановительной хирургии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.1 Химическое строение диальдегиддекстранов, полученных периодатным окислением в различных условиях

Для периодатного окисления чаще других используют гомофазное окисление периодатом натрия в водном растворе. Молекула декстрана имеет три vicinalных гидроксильных группы в ангидроглюкозном звене (АГЗ). В зависимости от соотношения полисахарид : периодат окисление декстрана протекает в две стадии с образованием продуктов трех типов: II, III и IV (схема 1).

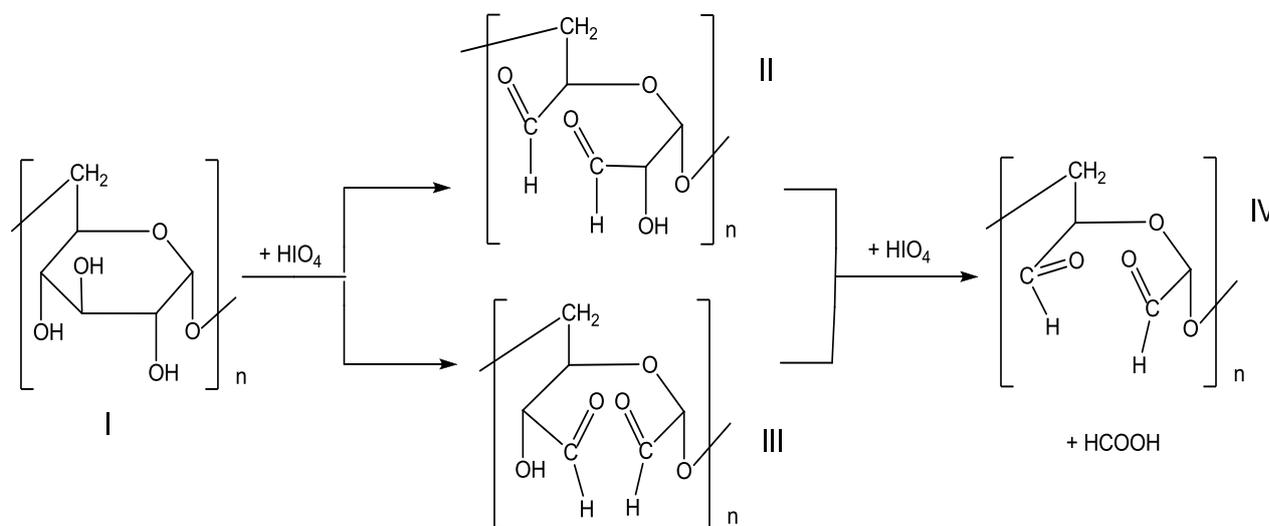


Схема 1

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.

Соотношение звеньев II, III и IV после полного завершения реакции зависит от соотношения периодат : ангидроглюкозное звено (АГЗ) (таблица 1).

Таблица 1 – Зависимость степени окисления декстрана от соотношения периодат : декстран

Периодат:100 АГЗ, мол. % (Полиглюкин)	Число окисленных звеньев II+III+IV	Расчет		Эксп. значение IV по выдел. НСООН
		II+III	IV	
4,1	7	7	-	-
12	12	13	-	1
20	18	16	2	2,2
38	27	16	11	13
102	52	2	50	51
200	84	-	84	85

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 с выделением муравьиной кислоты. Таким образом, диальдегиддекстраны со степенью окисления выше 50% содержат только звенья типа IV. Результаты титрования выделяющейся в реакции муравьиной кислоты полностью согласуются с результатами определения степени окисления полученных диальдегиддекстранов.

Степень окисления декстрана ($\gamma_{ок}$) мало зависит от исходной молекулярной массы полимера и определяется только соотношением периодат : декстран (рисунок 1).

Для изучения химического строения окисленных звеньев диальдегиддекстрана использовали ИК-спектроскопию с Фурье-преобразованием и ЯМР ^{13}C спектроскопию.

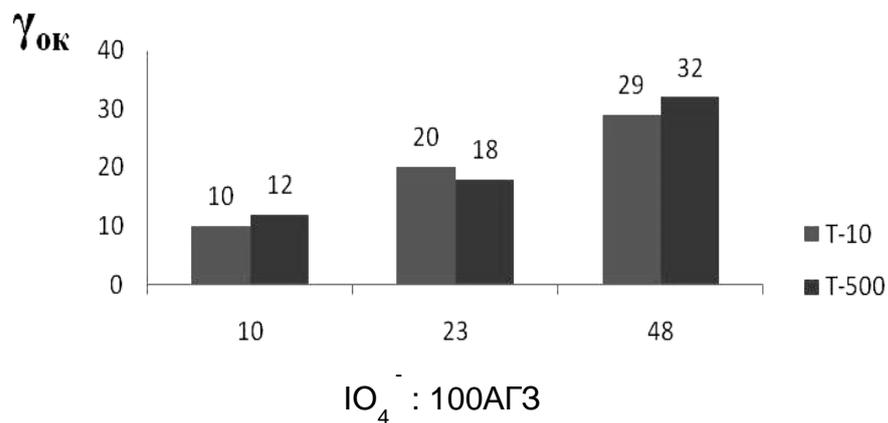


Рисунок 1 – Влияние молекулярной массы исходного декстрана на степень окисления периодатом натрия в водной среде. Т-10, Т-500 – марки декстрана

В ИК спектре полностью окисленного диальдегиддекстрана (рисунок 2), снятого из твердого высушенного образца, не обнаруживается характеристическая полоса поглощения карбонила альдегидной группы.

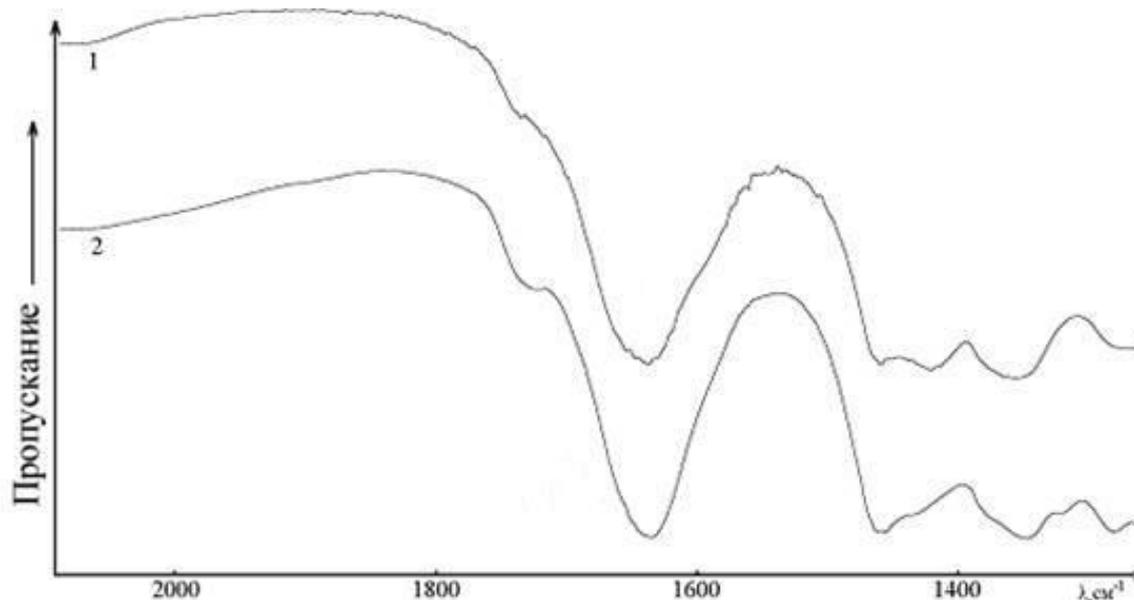
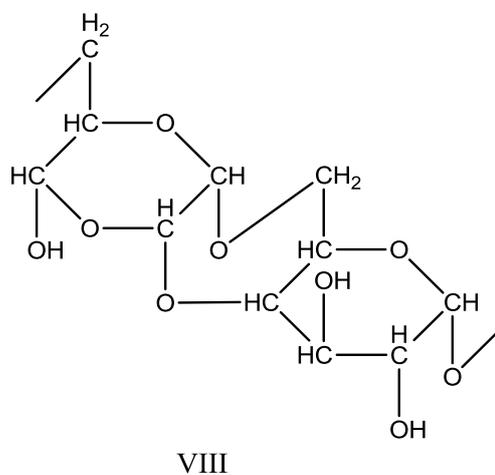
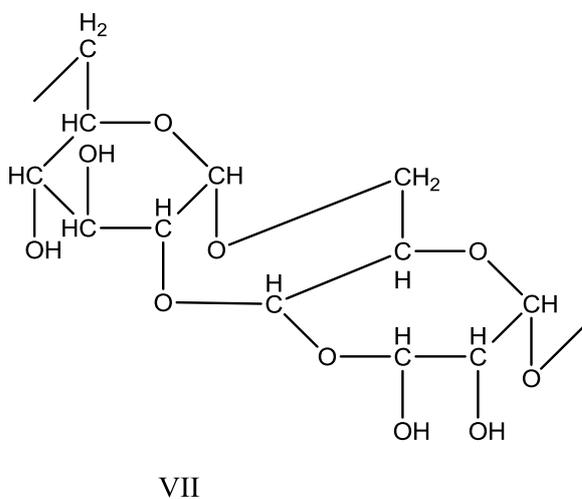
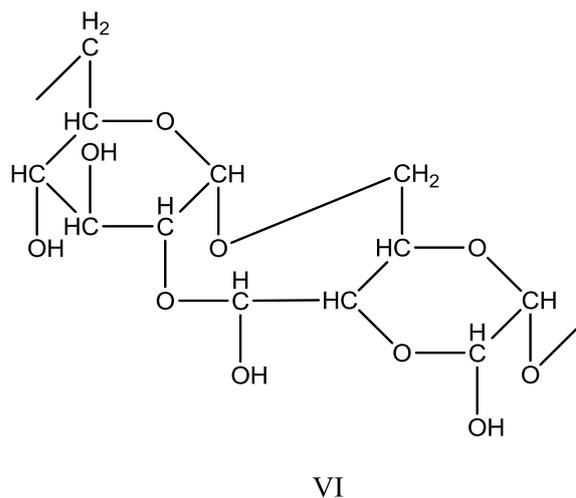
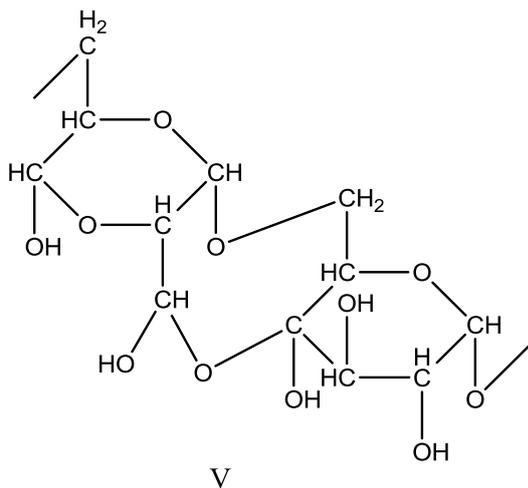


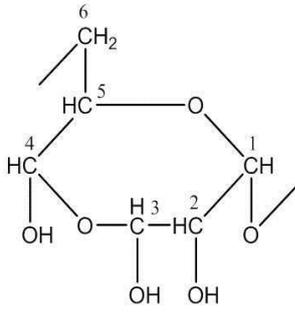
Рисунок 2 – ИК-спектр диальдегиддекстрана: (1) $\gamma_{ок} = 14,1 \%$; (2) $\gamma_{ок} = 100\%$

Полоса поглощения на рисунке 2, соответствующая волновому числу 1630 см^{-1} , не относится к сигналу альдегидной группы, так как характеристическая полоса валентных колебаний карбонила альдегидной группы является одной из самых сильных и имеет очень большую молярную экстинкцию.

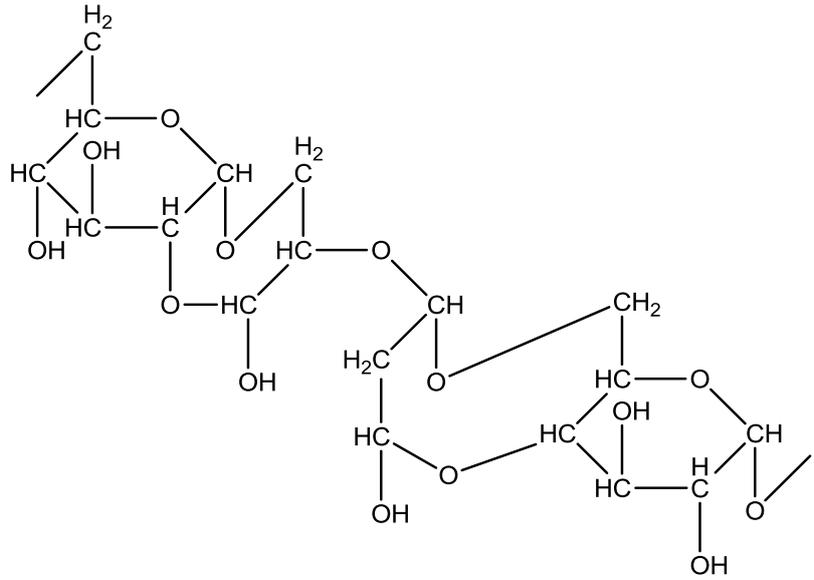
Анализ ЯМР ^{13}C спектров показал, что в водном растворе окисленные звенья существуют в виде циклических полуацеталей. В спектрах ЯМР ^{13}C , снятых из водного раствора в D_2O , отсутствуют сигналы атомов углерода карбонильной группы.

В составе окисленных звеньев можно предположить наличие следующих структур V-XVI:

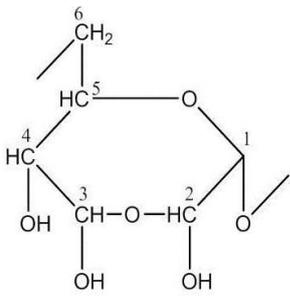




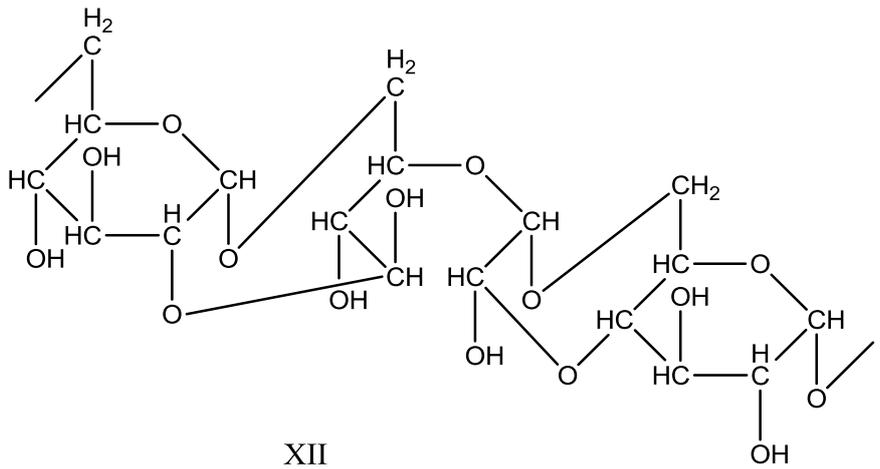
IX



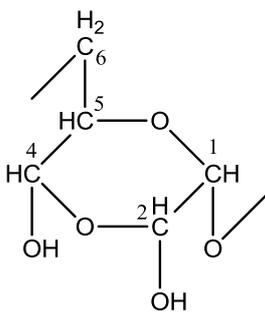
XI



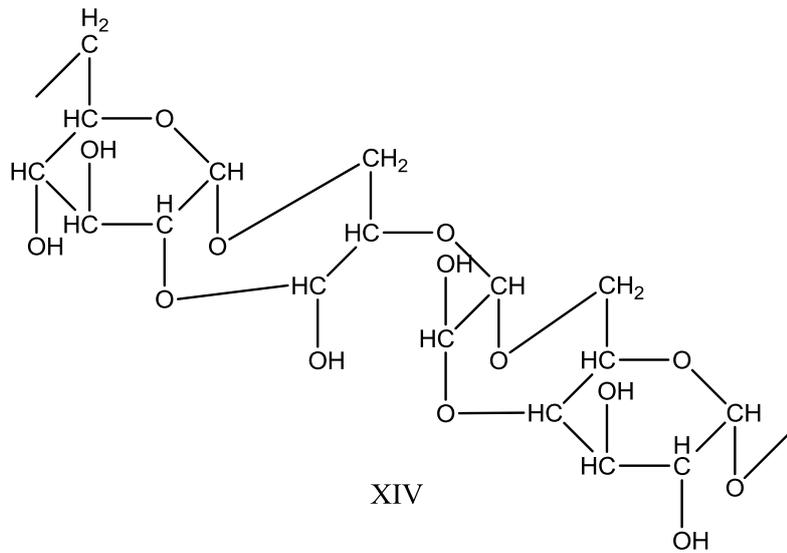
X



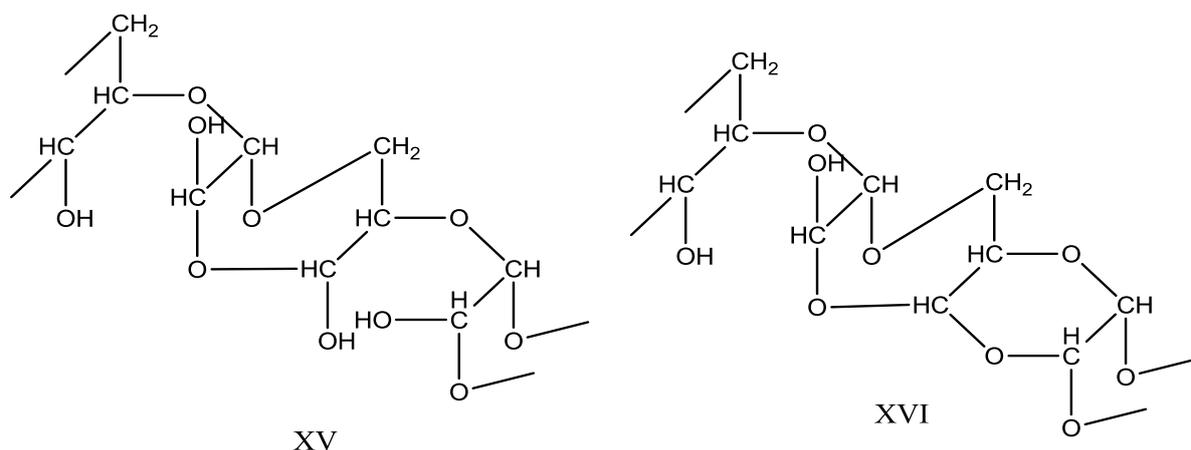
XII



XIII



XIV



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. Отсутствие существенных изменений ММР диальдегиддекстрана по сравнению с исходным декстраном указывает на отсутствие сшивок такого типа. Таких взаимодействий не обнаружено.

Кроме циклических структур можно предположить существование незамкнутых циклов, содержащих альдегидные группы в гидратированной форме (схема 2):

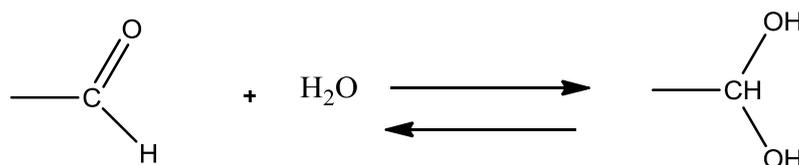


Схема 2

Однако в спектрах ЯМР ¹³C диальдегиддекстранов не обнаружено сигналов углеродных атомов альдегидных групп в гидратированной форме (100,9; 91,0 м.д.).

Образование внутримолекулярных полуацетальных связей в случае ДАД низких степеней окисления может приводить к образованию структур V-XII. В этом случае можно допустить, что для ДАД низкой степени окисления всегда рядом с окисленным звеном находятся неокисленные ангидроглюкозные звенья. В этом случае можно допустить, что для ДАД низкой степени

окисления всегда рядом с окисленным звеном находятся неокисленные ангидроглюкозные звенья.

Спектры ЯМР ^{13}C диальдегиддекстранов низких степеней окисления не содержат сигналов карбонильных атомов углерода. Они содержат сигналы ацетальных углеродов C(1) 101,1; 97,94; 96,15; C(2)-C(5) 94,74; 89,64; 88,17 м.д. окисленных звеньев и ацетального углерода ангидроглюкозного звена и три сигнала неацетальных углеродов окисленных звеньев C(2), C(4) 80,80; 79,61; C(6) 65,55 м.д. (рисунки 3, 4).



Рисунок 3 – Сигналы ацетальных углеродов

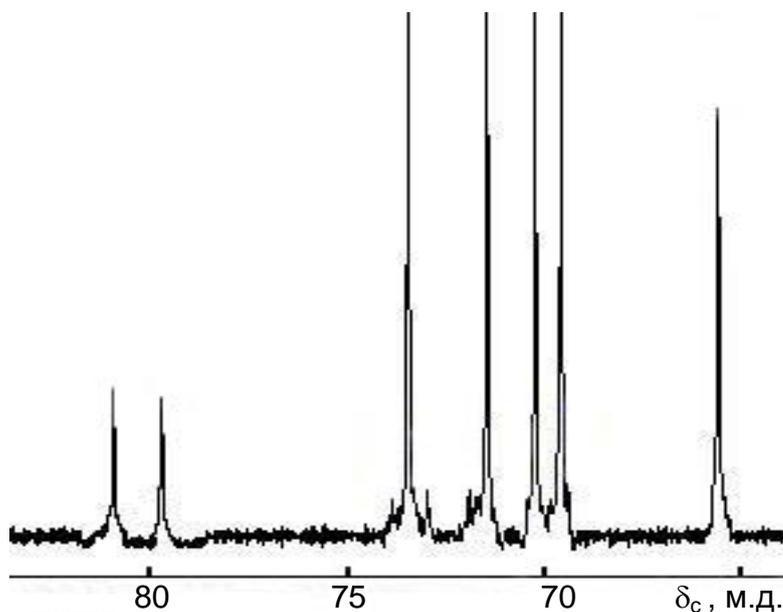


Рисунок 4 – Сигналы неацетальных углеродов

В процессе образования циклических полуацеталей атом C(6) не включается в циклы, и основная цепь ДАД всех типов остается открытой. Поэтому сигнал углерода C(6) 65,55 м.д. не претерпевает сдвига в процессе образования полуацеталей. Таким образом, наиболее вероятным следует считать существование циклических продуктов IX, X, и XIII.

Спектры ЯМР ^{13}C ДАД средних степеней окисления (рисунок 5) с трудом поддаются интерпретации ввиду существования всех указанных структур, а также продуктов конденсации двух соседних звеньев типа II, III и IV в различных комбинациях.

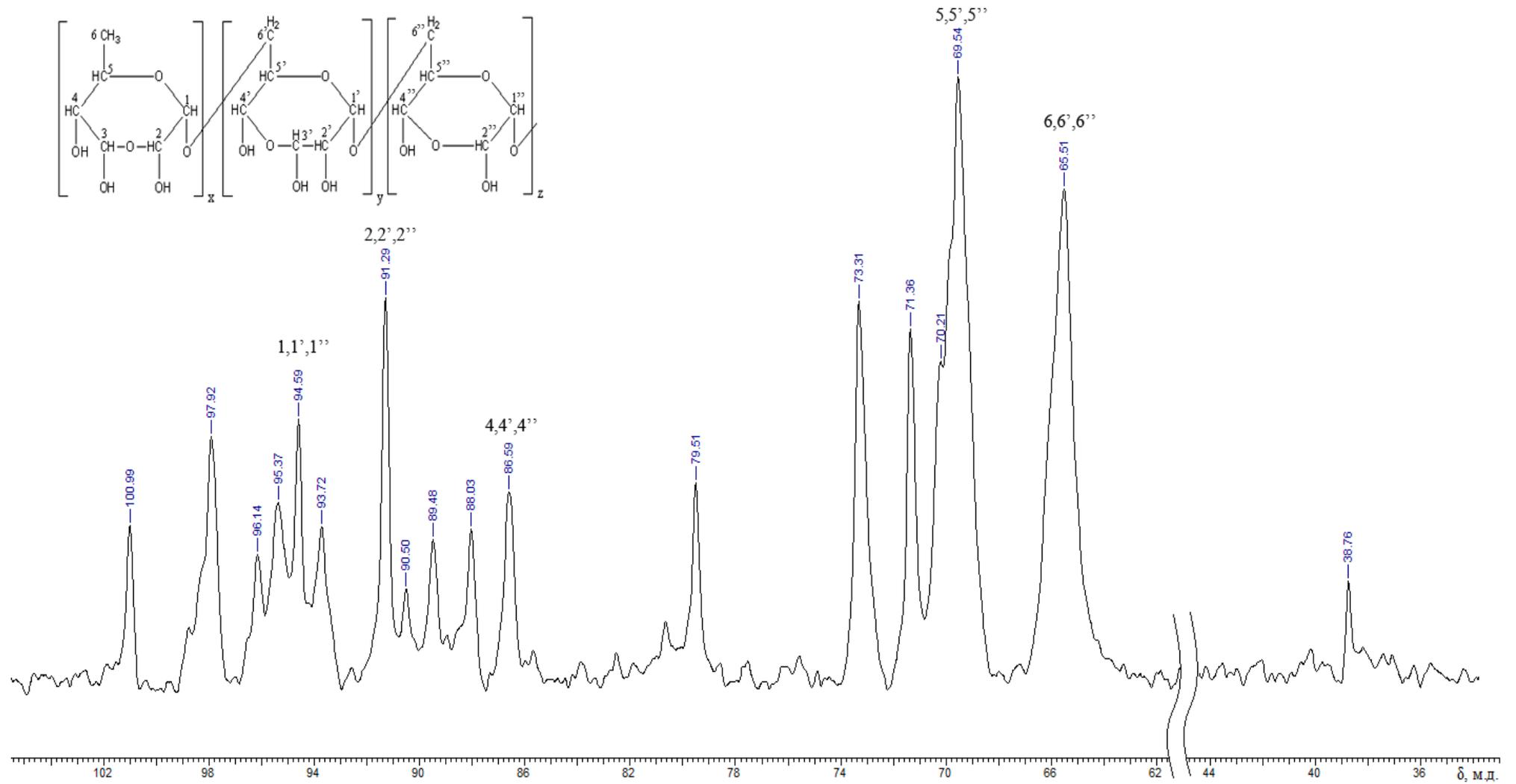


Рисунок 5 – ЯМР ^{13}C спектр среднеокисленного диальдегиддекстрана $\gamma_{\text{ок}}=69,4\%$ в D_2O

Для высокоокисленных полимеров, содержащих только звенья IV, возможно образование циклических полуацеталей четырех типов: XIII, XIV, XV, XVI. Циклы XII, XIII, XVI образованы таким образом, что одна из альдегидных групп находится в виде полного ацетала и не может быть восстанавливающей. Наличие этих структур должно приводить к снижению восстанавливающей способности ДАД вдвое. Экспериментально при титровании йодом такое снижение не наблюдается, поэтому наличие данных структур маловероятно. Для образования звеньев V, VI, XI, XII, XIV требуется наличие соседнего неокисленного звена, которые имеются в полимерах низкой степени окисления. Анализ спектров ^{13}C ЯМР показал наличие в ДАД высоких степеней окисления, содержащих только звенья типа IV, трех типов ацетальных углеродов (рис. 4, 5) C(1) – 95,59 м.д., C(2), C(4) – 91,40 м.д. и 86,76 м.д. и двух неацетальных C(5) – 69,93; C(6) – 65,44 м.д., отвечающих звену XIII. Сигналы низкой интенсивности с химическими сдвигами 94.5; 90.64; 68.70 м.д. могут быть отнесены к аналогичному кольцу другого диастереомерного состава.

В спектрах образцов, снятых из ДМСО- d_6 , так же отсутствуют сигналы альдегидных групп и наблюдаются аналогичные химические сдвиги, что и в образце, снятого из D_2O (рисунок б).

Помимо спектров, снятых из раствора, были сняты и спектры из твердого тела. Исходя из рисунка б, на котором расположены все вышеперечисленные спектры, можно сделать вывод о том, что диальдегиддекстран высокой степени окисления не содержит свободных альдегидных групп.

В спектрах ЯМР ^{13}C высокоокисленного ДАД, снятых из ДМСО D_6 , 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 б).

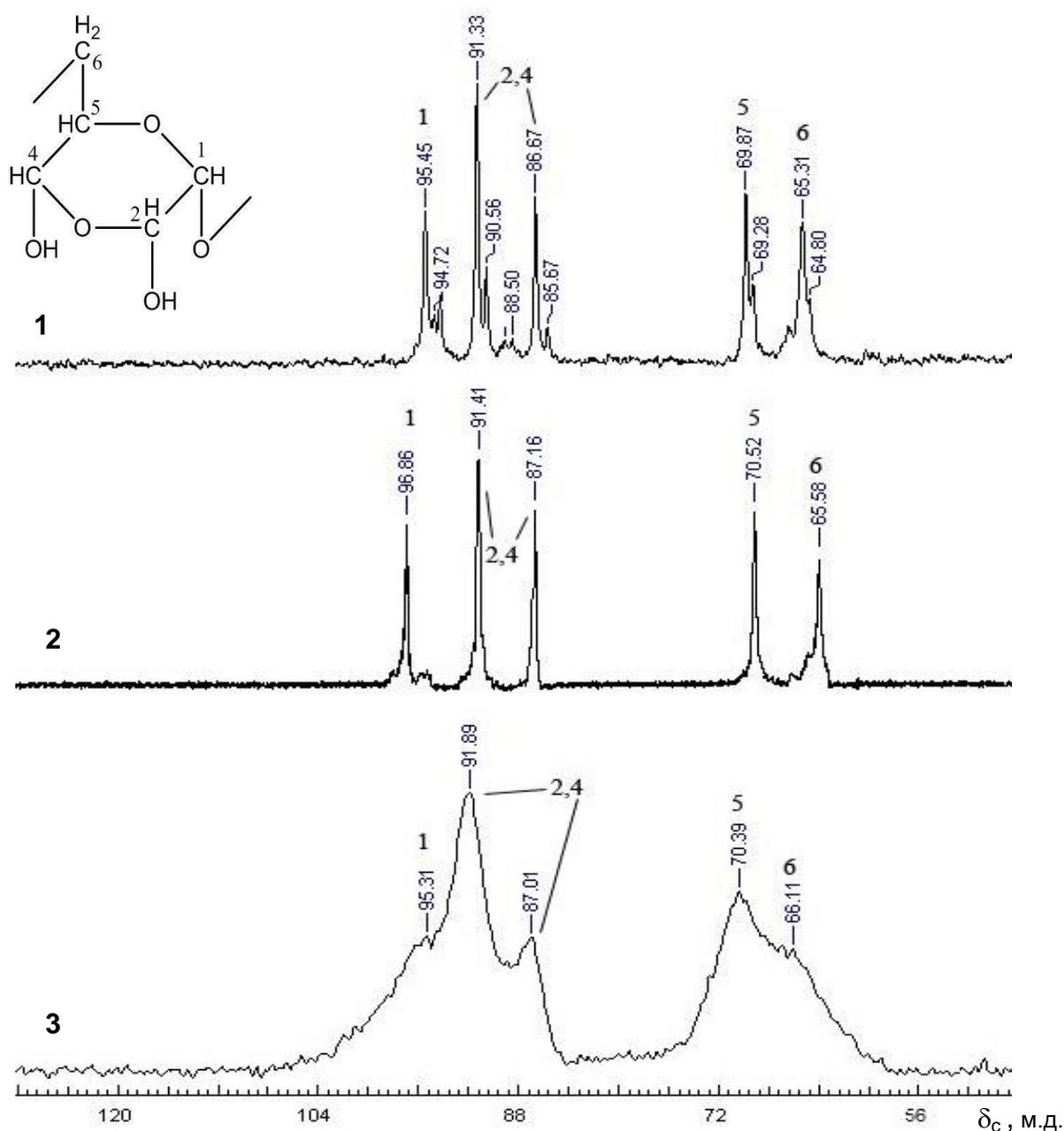
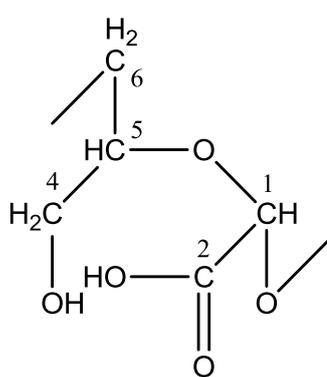
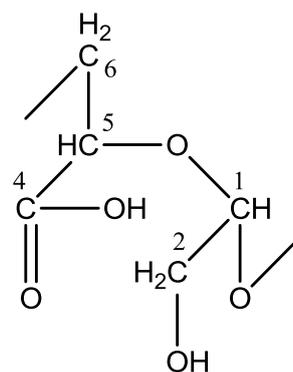


Рисунок 6 – Спектры ЯМР ^{13}C ДАД, $\gamma_{\text{ок}}=95,2$ снятые: 1 - из раствора в D_2O ; 2 - из раствора в DMSO-d_6 ; 3 - из твердого тела

В щелочной среде происходит реакция внутримолекулярного диспропорционирования с образованием звеньев XVI и XVII. При этом происходит размыкание полуацетального цикла, и в спектрах ЯМР ^{13}C появляются сигналы 156,1 и 155,0 м.д. углеродов карбоксильных групп. Такие разомкнутые циклы гидролитически не устойчивы, поэтому их образование сопровождается резким снижением молекулярной массы.



XVII



XVIII

Большую роль в отнесении сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C диальдегиддекстранов сыграл анализ спектров этих полимеров после восстановления окисленных звеньев избытком NaBH_4 сопровождающегося раскрытием циклов с образованием ациклических диольных фрагментов.

В УФ-спектрах не содержится отдельных пиков поглощения, однако по мере увеличения степени окисления возрастает интенсивность поглощения в области 200-240 нм. Этот широкий пик можно использовать для количественного анализа, но он имеет относительно небольшую экстинкцию и поэтому точность такого метода невысока.

2.2. Химическое строение диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы, полученной периодатным окислением в различных условиях

В процессе периодатного окисления карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) происходит разрыв связи $\text{C}(2)\text{-C}(3)$ между двумя vicinalными гидроксилами ангидроглюкозного цикла. В молекуле КМЦ, как и у других 1-4 полисахаридов имеется только одна связь способная к периодатному окислению и только один вариант окисленного звена.

Основная реакция окисления с образованием диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы (ДАКМЦ) сопровождается побочными реакциями диспропорционирования и доокисления (схема 3).

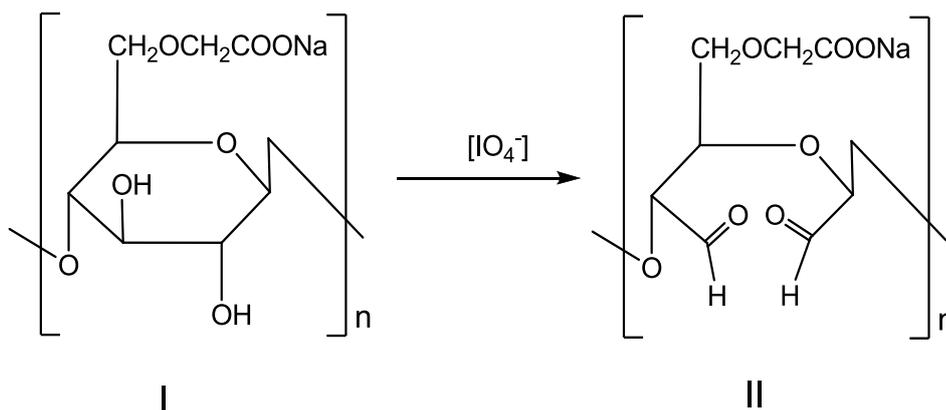


Схема 3

Контроль за процессом окисления проводили методом УФ-спектроскопии по расходованию периодат-иона. Он имеет отчетливый пик поглощения с достаточно большим коэффициентом экстинкции в УФ-области $\epsilon_{\lambda=223}=9651$ л/(моль·см) (рисунок 7).

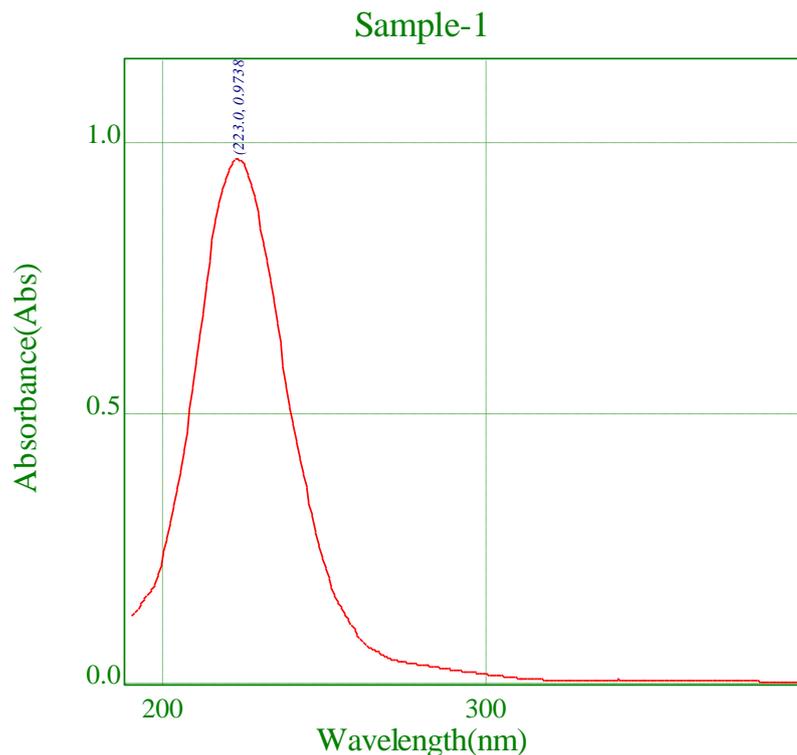


Рисунок 7 – Электронный спектр поглощения периодат-иона

Как видно из таблицы 2, при увеличении количества периодата в реакции, увеличивается степень окисления, однако 100% окисленный полимер при соотношении $\text{NaIO}_4:100\text{AGЗ}$ равном 100 получить не удалось.

Таблица 2 – Зависимость степени окисления карбоксиметилцеллюлозы от соотношения периодат : КМЦ

Соотношение NaIO_4 :100АГЗ	Содержание альдегидных групп, найденное обратным титрованием, моль. %
10	12,9
30	37,1
100	80,0

В ИК-спектре диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы независимо от содержания окисленных звеньев отсутствует характеристическая полоса валентных колебаний карбонила альдегидной группы в области 1800 см^{-1} . Эта полоса является одной из самых сильных, имеет очень большую молярную экстинкцию и обычно проявляется даже при незначительном содержании карбонильных групп в образце, не превышающем 1-2 моль % (рисунок 8).

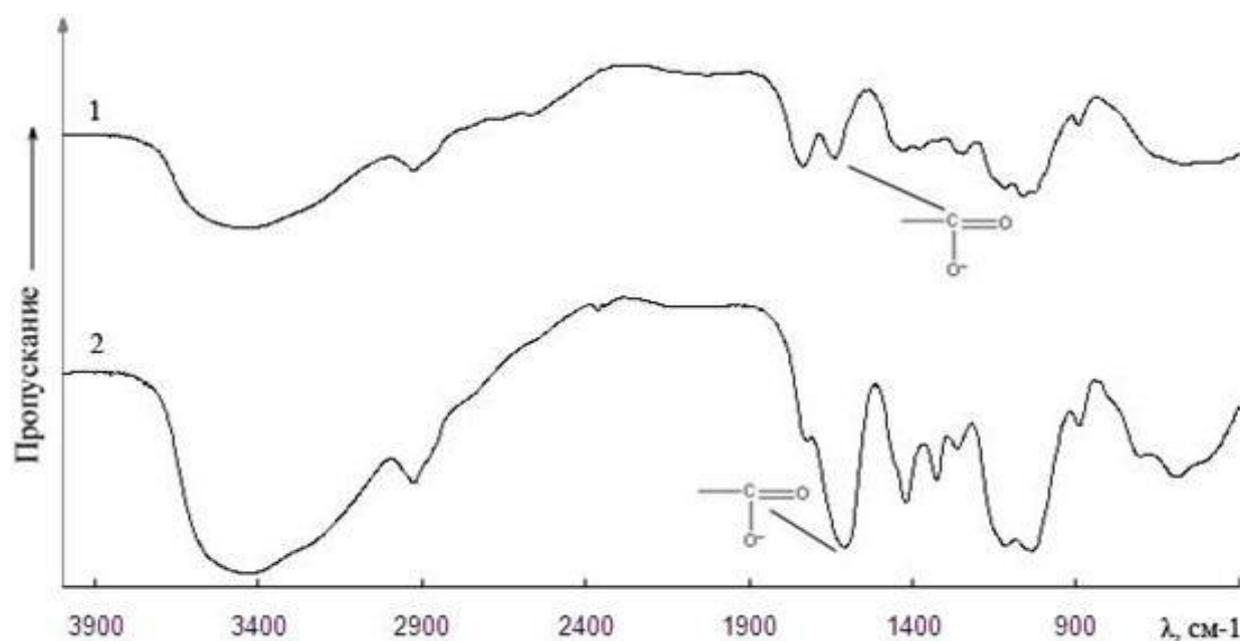


Рисунок 8 – ИК - спектры: 1 – низкоокисленная ДАКМЦ ($\gamma_{\text{ок}} = 15\%$); 2 – высокоокисленная ДАКМЦ ($\gamma_{\text{ок}} = 80\%$)

Изучение ЯМР ^{13}C спектров образцов ДАКМЦ различных степеней окисления показало, что также как и в случае с ДАД, альдегидные группы в окисленных звеньях существуют в виде циклических полуацеталей. В спектрах ЯМР ^{13}C отсутствуют сигналы углеродов альдегидных групп в области 195-200 м.д. В ряде работ рассматривается предположительное существование

гидратированной формы альдегидных групп в водном растворе, однако и таких сигналов в спектрах не обнаружено.

В спектре исходной карбоксиметилцеллюлозы (рисунок 9) сигнал 102,77 м.д. соответствует C(1) атому углерода ангидроглюкозного звена КМЦ. Метиленовая группа C(7) при карбоксильной группе имеет химический сдвиг 71,79 м.д. Карбонильные сигналы C(8) проявляются в слабом поле и имеют химические сдвиги: 179,21 м.д. – для свободной кислоты и 178,37 м.д. для карбоксилат аниона. Сигнал высокой интенсивности при 60,55 м.д. согласно литературным данным [13] относят к сигналу C'(6) ангидроглюкозного звена немодифицированного атома целлюлозы, а модифицированный атом C(6) имеет химический сдвиг равный 70,98 м.д. Химический сдвиг атома углерода C(5) 82,56 м.д.

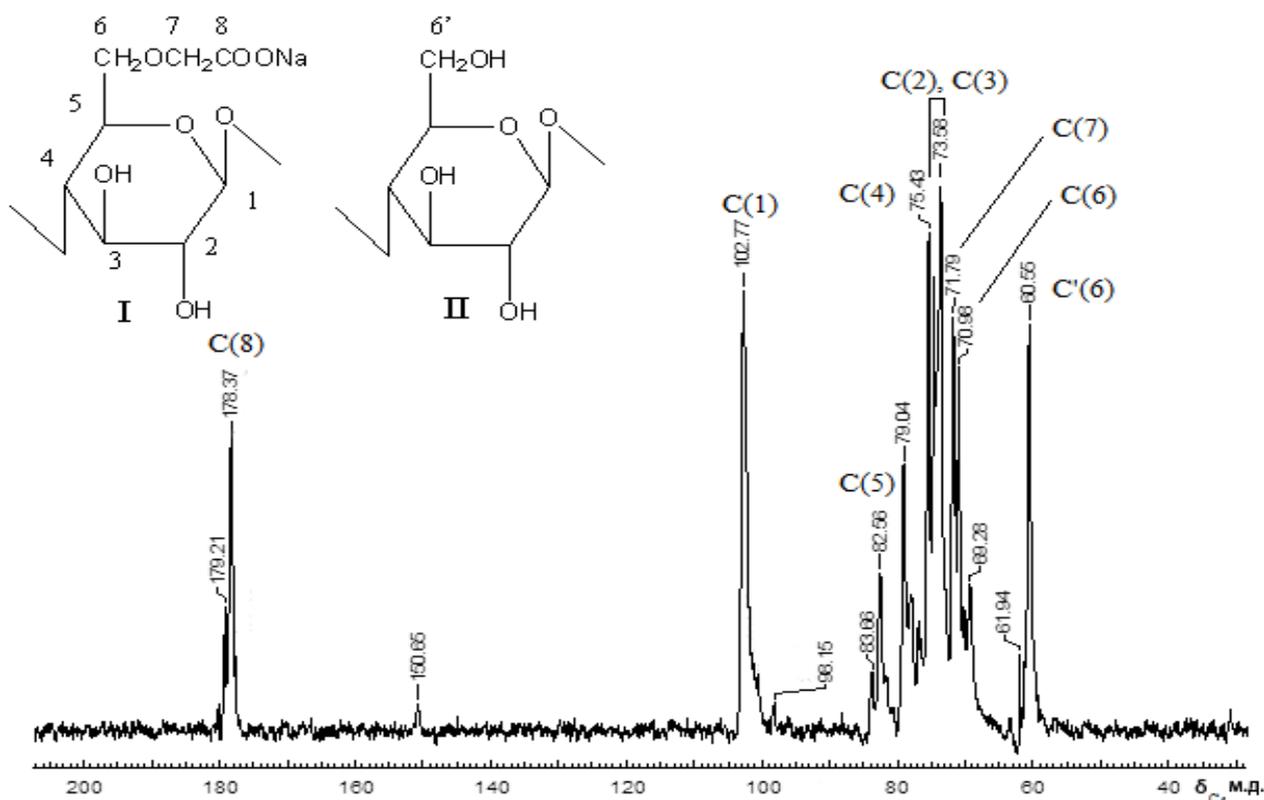


Рисунок 9 – ЯМР ^{13}C спектр исходной КМЦ в подщелаченном растворе D_2O

Анализ спектров ЯМР ^{13}C ДАКМЦ показал, что с увеличением степени окисления уменьшается интенсивность пиков 74,62 и 73,58 м.д. Это дает основание предполагать, что они относятся к сигналам C(2) и C(3)

ангидроглюкозного звена ДАКМЦ. Чем выше степень окисления, тем ниже их интенсивность и, соответственно, ниже содержание атомов углерода этого типа в составе полимера.

Сигнал атома углерода $C'(4)$ имеет химический сдвиг 75,43 м.д. При переходе от низкоокисленных полимеров к высокоокисленным интенсивность этого пика практически не изменяется, что согласуется со структурой окисленного продукта (III).

С увеличением степени окисления ДАКМЦ возрастает как количество, так и интенсивность сигналов полуацетальных атомов углерода C-O-C в области 85-100 м.д. (рисунок 10). Это связано с увеличением числа и содержания диастереомерных полуацетальных структур.

В высокоокисленном полимере сигнал 99,89 и 99,62 м.д. соответствуют атому $C''(4)$. Он претерпевает сдвиг в слабое поле вследствие того, что у соседнего атома углерода $C''(3)$ появляется более электроотрицательный заместитель. Пики 96,25; 95,51; 94,76 м.д. относятся к 4 атому углерода в разветвлениях 1-6 окисленной карбоксиметилцеллюлозы. Сигналы 91,95; 91,20; 90,45 м.д. принадлежат атому $C''(2)$, а сигналы 89,67; 88,59; 88,30; 87,99 м.д. атому $C''(3)$.

Следует отметить, что немодифицированные ангидроглюкозные циклы окисляются быстрее карбоксиметилированных и расходуются в первую очередь. Это особенно заметно в образцах с низкой степенью окисления $\gamma_{ок} < 10$ и в случае использования в реакции низкозамещенной КМЦ со степенью карбоксиметилирования менее 80.

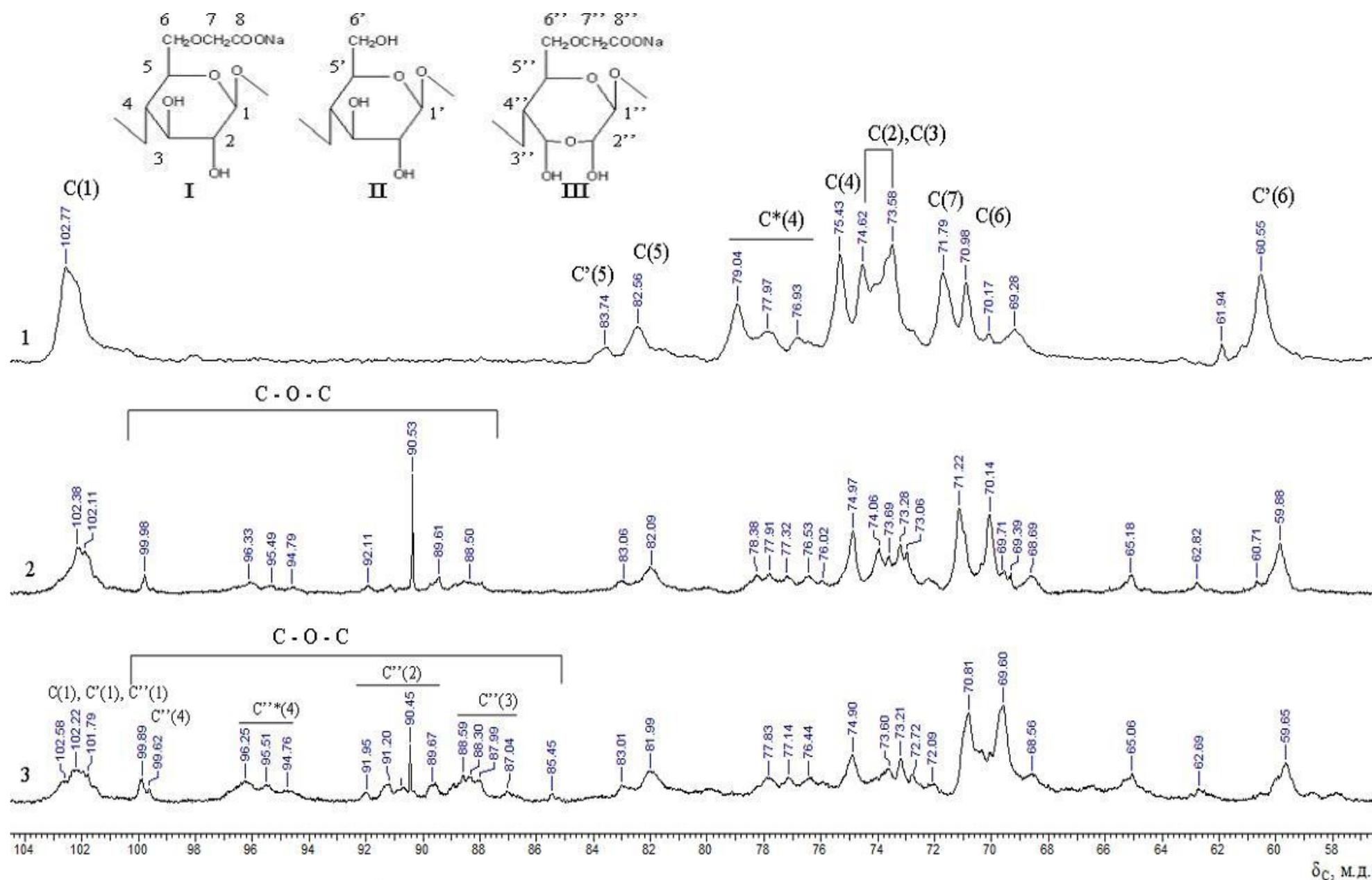


Рисунок 10 – Фрагменты ЯМР ^{13}C спектров: 1 – КМЦ; 2 – ДАКМЦ степень окисления 65%; 3 – ДАКМЦ степень окисления 80%

Для подтверждения структуры окисленных полимеров и более точного отнесения сигналов в спектрах ^{13}C были исследованы продукты восстановления ДАД и ДАКМЦ боргидридом натрия (схема 4).

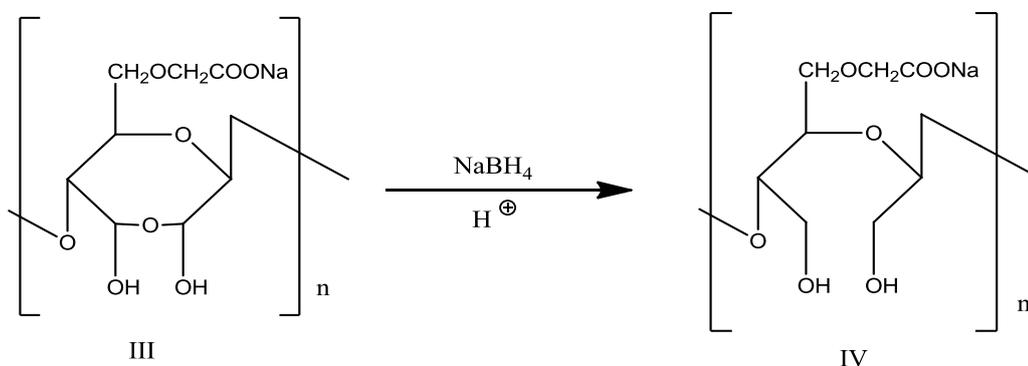


Схема 4

В результате восстановления образуются разомкнутые диолы, при этом полимер теряет способность растворяться в воде, однако продолжает растворяться в щелочном растворе. В спектрах ЯМР ^{13}C восстановленной ДАКМЦ исчезают сигналы углеродов ацетальных циклов (рисунок 11). Кроме того, в спектре появляются сигналы ангидроглюкозного восстановленного звена (IV): 103,79 м.д. – $\text{C}'''(1)$; 81,89 м.д. – $\text{C}'''(5)$; 79,80 м.д. – $\text{C}'''(4)$; 71,20 м.д. – $\text{C}'''(7)$; 70,05 м.д. – $\text{C}'''(6)$. Отнесение было сделано исходя из инкрементной схемы определения химических сдвигов.

Сигналы углерода $\text{C}'''(2)$ и $\text{C}'''(3)$ претерпевают сдвиг в сильное поле по отношению к исходным сигналам в окисленной карбоксиметилцеллюлозе $\text{C}''(2)$ и $\text{C}''(3)$, что согласуется с предполагаемой структурой. Отнесение было произведено на основании предположения, что в восстановленном продукте атомы углерода $\text{C}''(2)$ и $\text{C}''(3)$ связаны не с двумя, а только с одним атомом кислорода.

Сопоставляя данные ЯМР ^{13}C спектров снятых из водного раствора и из твердого образца можно предположить, что также как и ДАД, ни в твердом виде, ни в растворах, ДАКМЦ не содержит свободных альдегидных групп (рисунок 12). Об этом свидетельствует отсутствие сигнала альдегидного углерода в спектре в области 200 м.д. В целом, спектры идентичны с учетом очевидной разницы в разрешении.

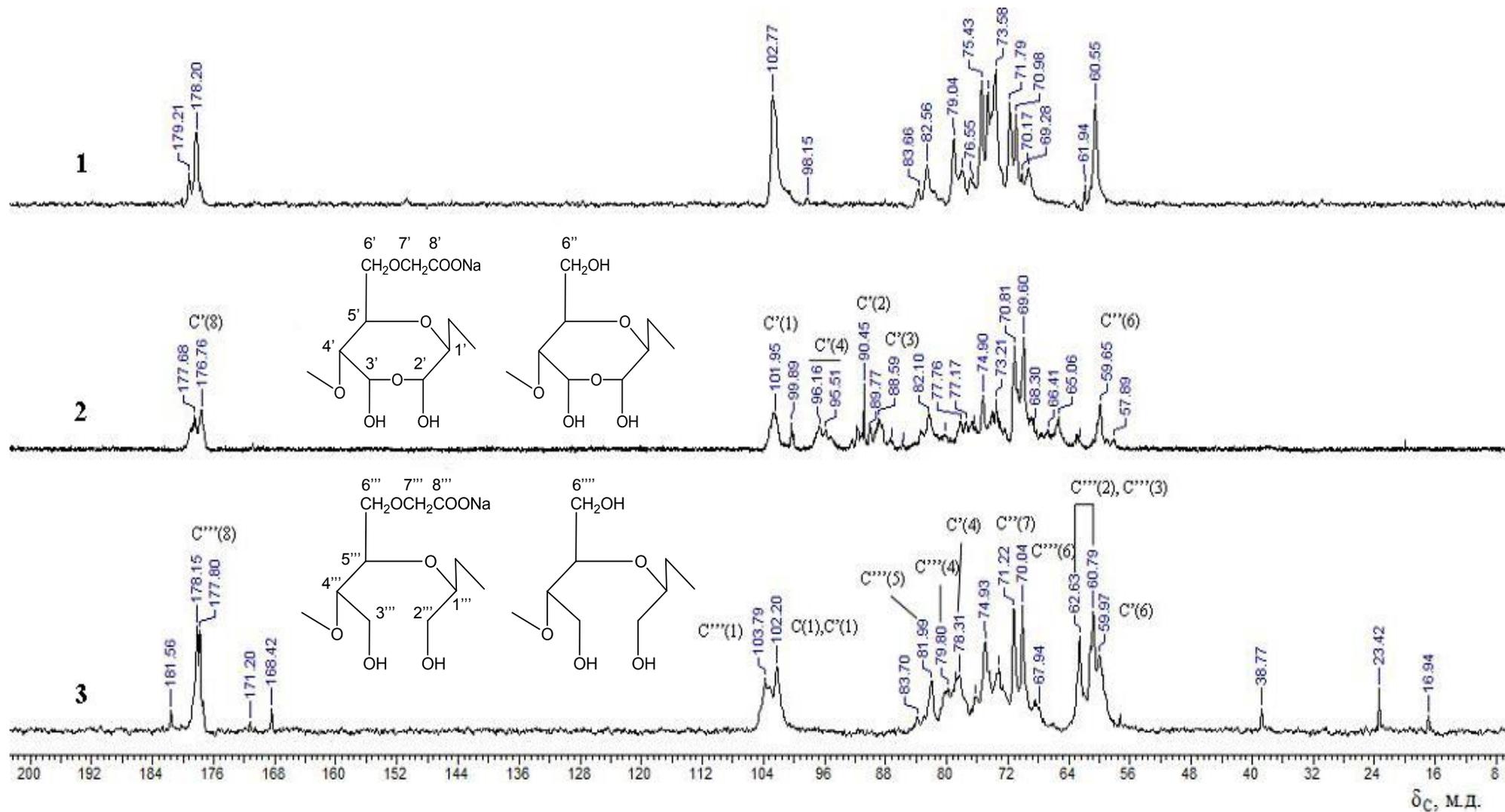


Рисунок 11 – ЯМР ^{13}C спектры диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы:

1 – КМЦ, 2 – высокоокисленная ДАКМЦ, 3 – продукт восстановления высокоокисленной ДАКМЦ

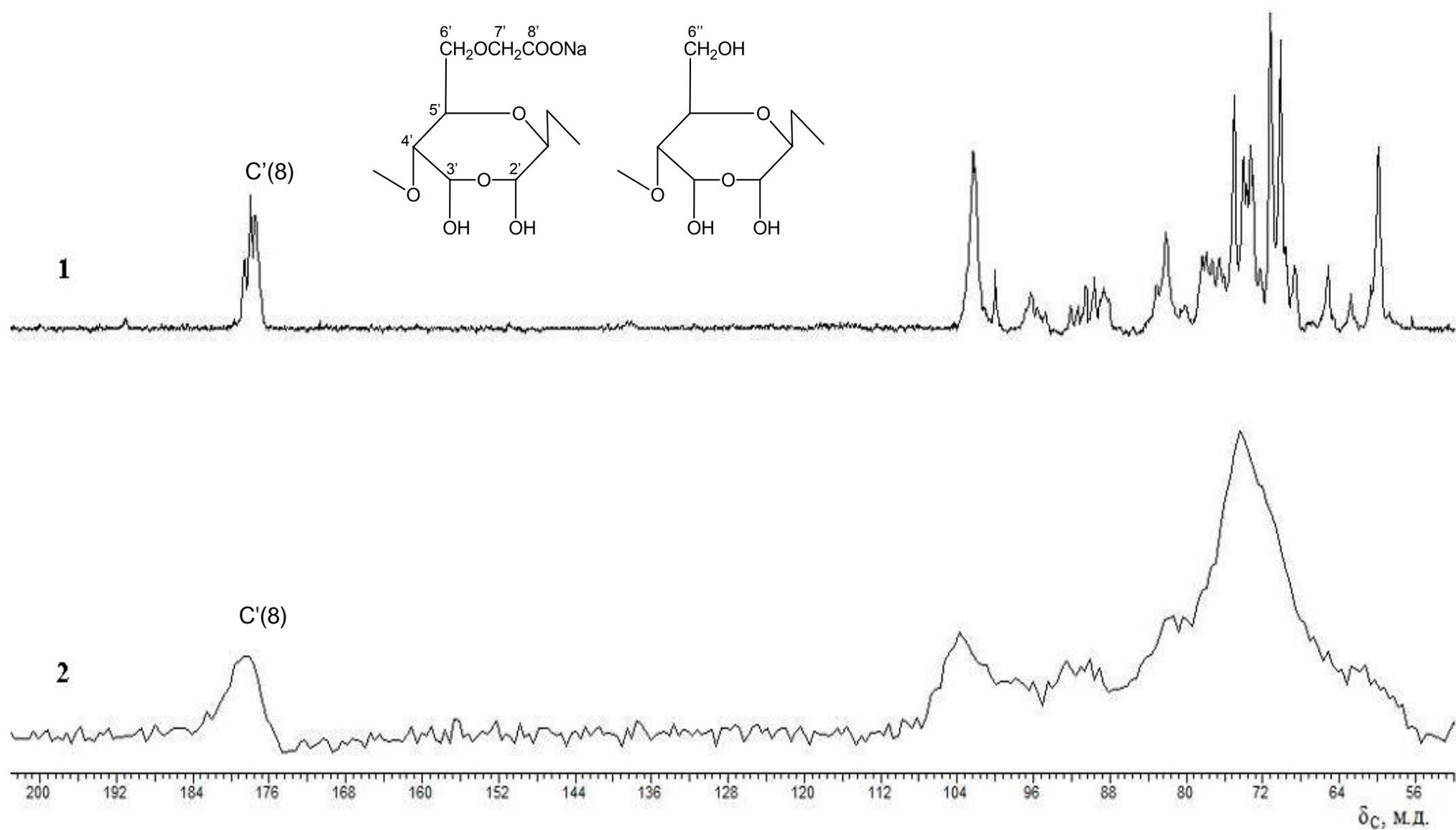
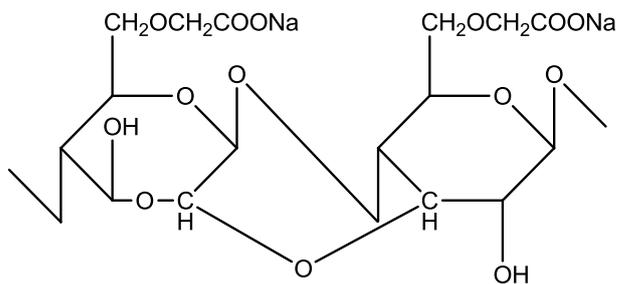
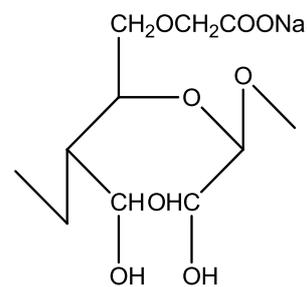


Рисунок 12 – ЯМР ^{13}C спектры высокоокисленной ДАКМЦ: 1 – снятый из раствора D_2O ; 2 – снятый в твердом теле

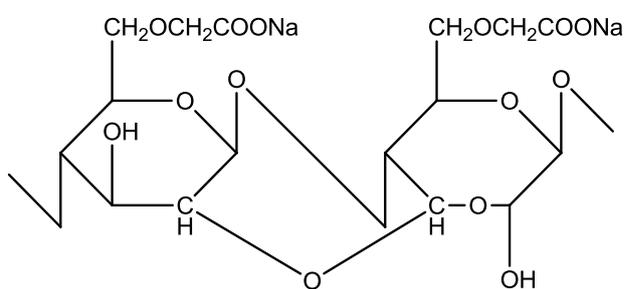
Таким образом, на основании этих данных предложены основные возможные структуры звеньев ДАКМЦ V-XII:



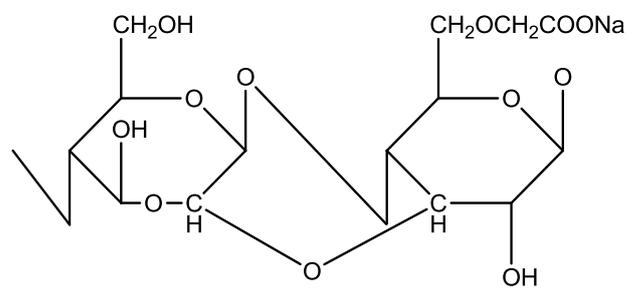
V



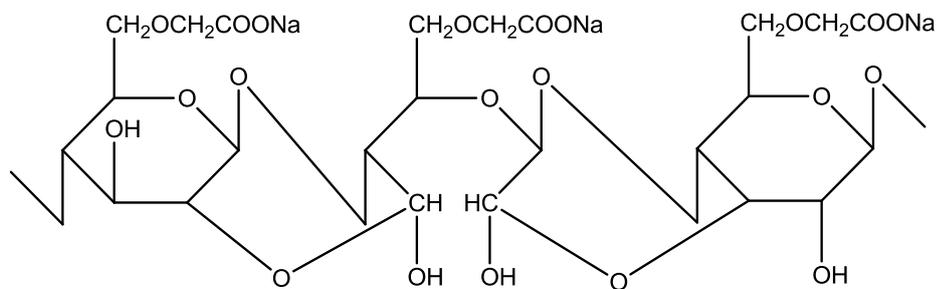
VII



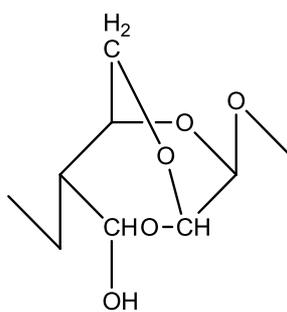
VI



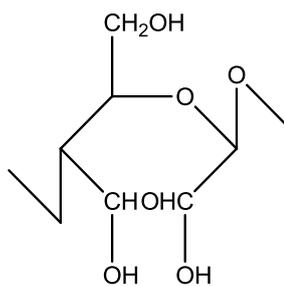
VIII



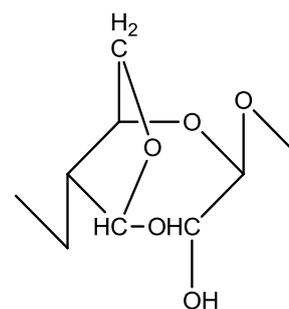
IX



X



XI



XII

Для низкоокисленной карбоксиметилцеллюлозы, где рядом с окисленным звеном находится неокисленное звено, наиболее вероятны структуры V – IX. Для среднеокисленных полимеров, в которых достаточно велика вероятность окисления немодифицированных звеньев целлюлозы, предпочтительны структуры V-VIII, X-XII.

Для высокоокисленных полимеров, в которых практически отсутствуют неокисленные звенья, наиболее вероятными являются структуры VII, XI, однако также возможны звенья X и XII.

2.3. Влияние структуры 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 5, 6).

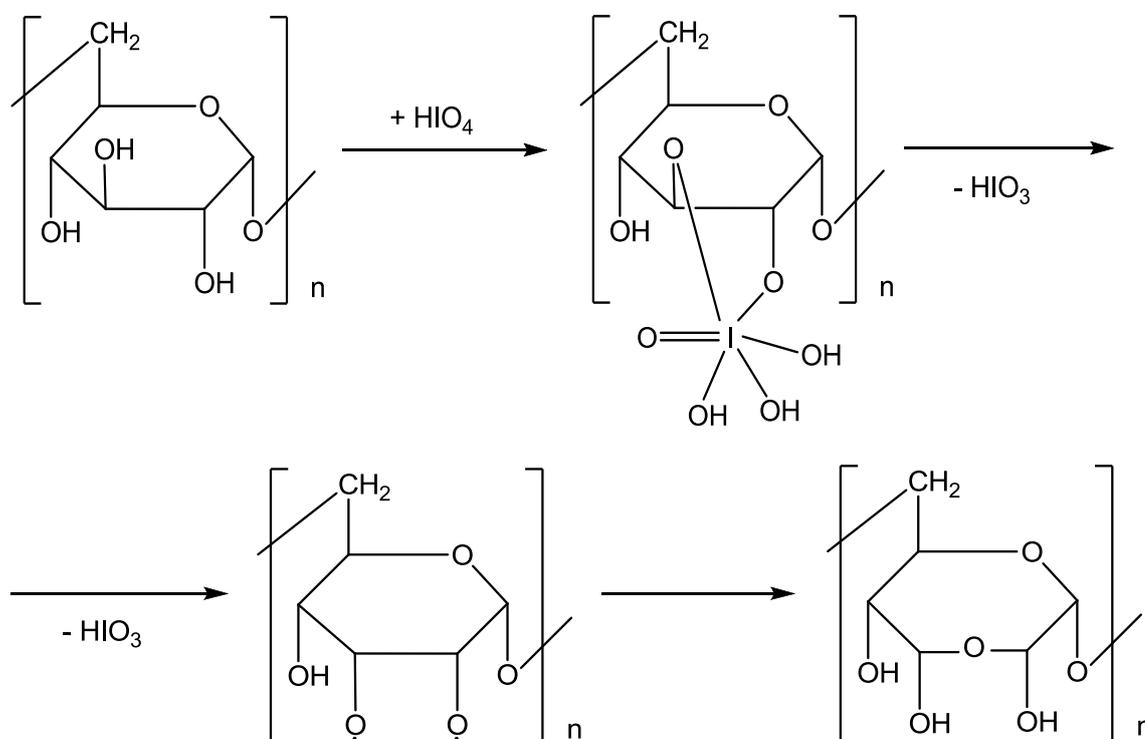


Схема 5

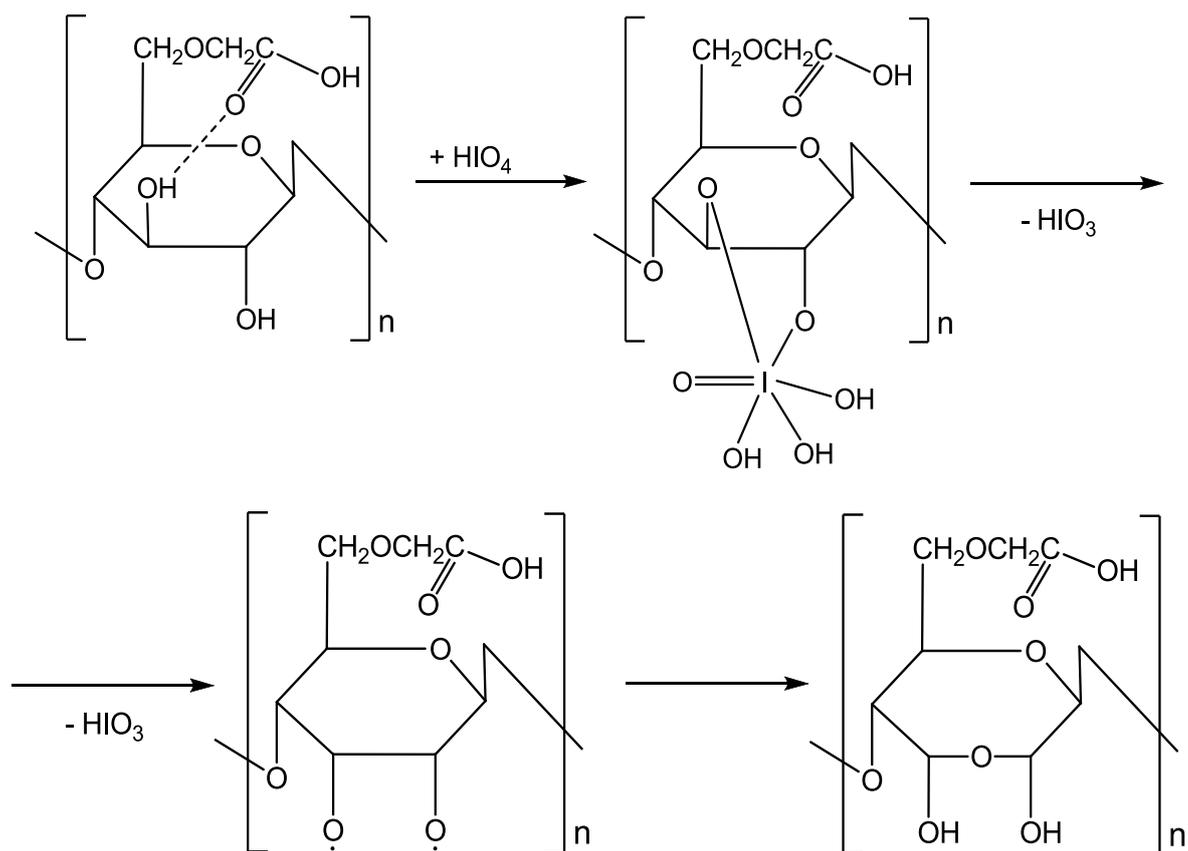


Схема 6

В случае ДАД скорость реакции не зависит от молекулярной массы исходного полимера, полностью заканчивается за 2 часа и не сопровождается снижением его молекулярной массы (рисунок 13).

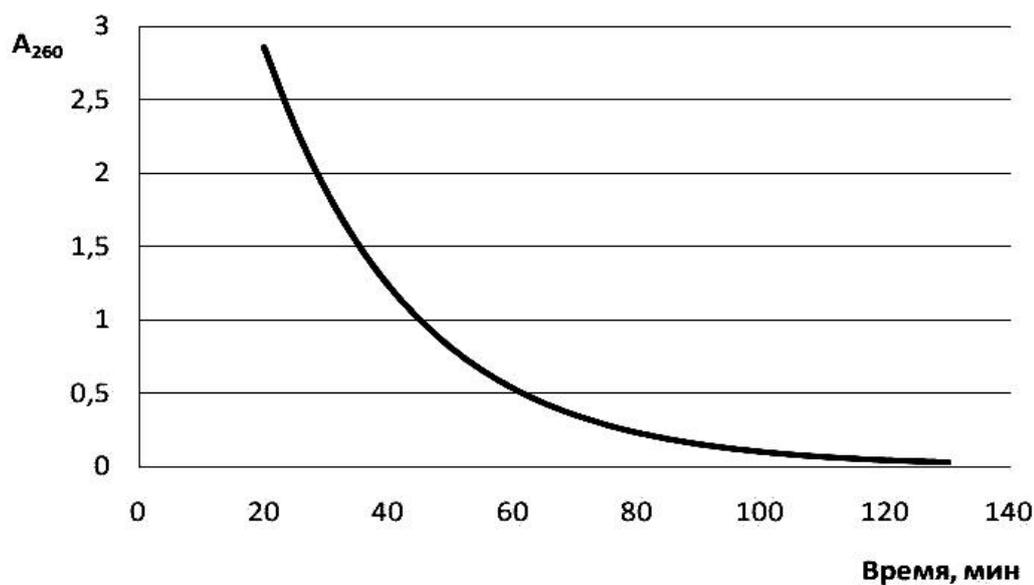


Рисунок 13 – Изменение концентрации периодат-иона в реакционной среде, определенное спектрофотометрическим методом

В отличие от декстрана, 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 (схема 6).

Процесс протекает значительно медленнее и заканчивается за трое суток в темноте при мольном соотношении периодат : ангидроглюкозное звено (АГЗ) равном 1:1 (рисунок 14).

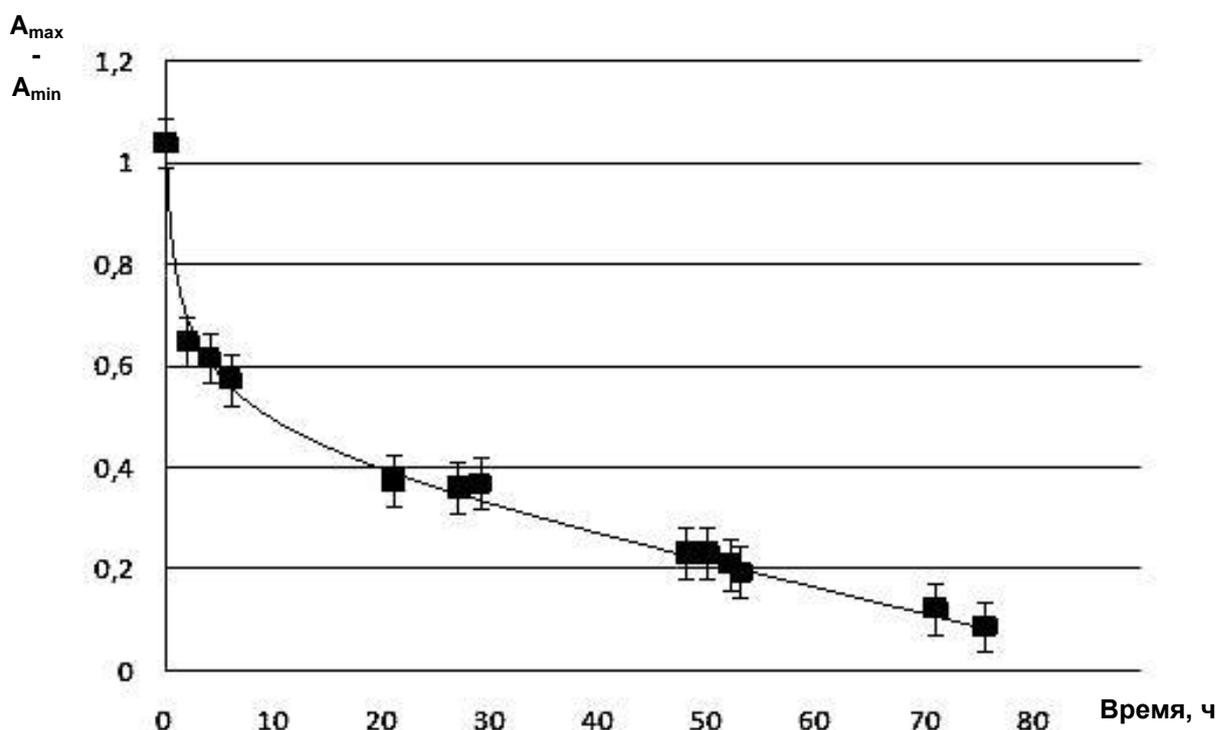


Рисунок 14 – Динамика расходования периодат-иона в процессе окисления КМЦ

Остаточные немодифицированные ангидроглюкозные циклы КМЦ, в которых отсутствует ингибирующее влияние карбоксильной группы, окисляются быстрее карбоксиметилированных 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 реакции. При повышенной температуре в присутствии избытка периодата ускоряется реакция доокисления альдегидных групп до кислотных (схема 7).

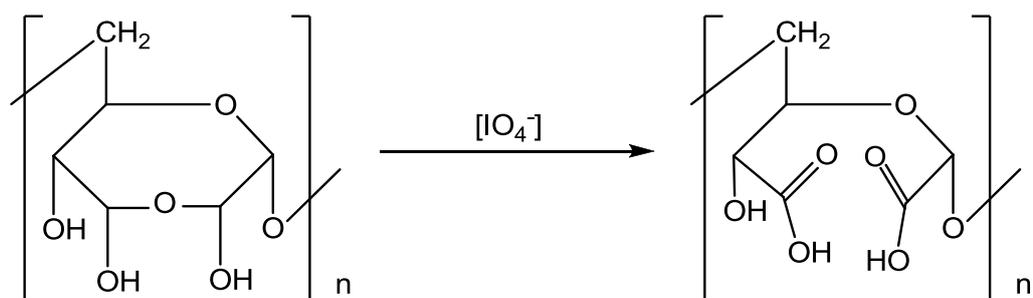


Схема 7

Кроме того, в щелочной среде возможно протекание реакции диспропорционирования двух альдегидных групп окисленного цикла с образованием ациклической оксикислоты (схема 8).

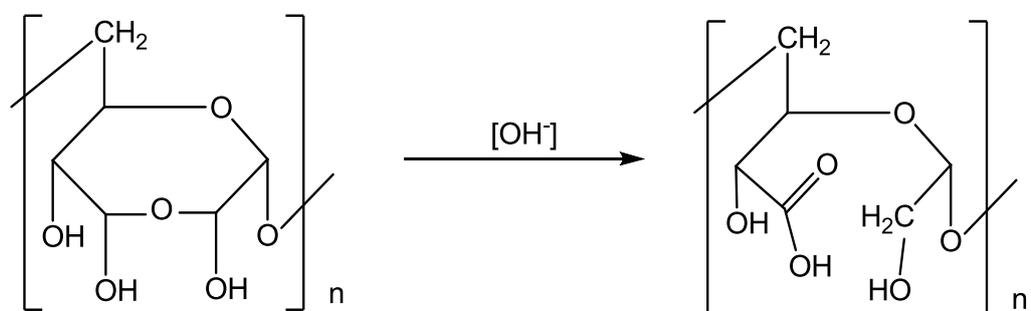


Схема 8

Обе реакции приводят к размыканию ангидроглюкозного цикла с образованием гидролитически неустойчивых 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 ($\gamma_{\text{ок}} < 20$) кривые ММР полученных полимеров практически не отличаются от исходных, независимо от молекулярной массы декстранов. Увеличение степени окисления приводит к падению молекулярной массы без значительных изменений в полидисперсности (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние гомогенного периодатного окисления на молекулярно-массовые характеристики декстранов.

Марка исходного декстрана	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, приводящим к существенному снижению молекулярной массы. Таким образом, степень окисления определяется соотношением КМЦ : периодат, а снижение молекулярной массы - временем реакции. В основном это снижение приходится на завершающий этап реакции, так как гидролиз проходит с разрывом уже образовавшихся окисленных звеньев. Резкого снижения молекулярной массы 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.

Полимеры, образующиеся при периодатном окислении, относительно устойчивы к гидролизу вследствие образования ацетальных циклов в окисленных звеньях. Их разрушение в кислой среде приводит к резкому падению молекулярно-массовых характеристик пропорциональному степени окисления ($\gamma_{ок}$).

Исследование гидролитической стабильности ДАД показало, что они вполне устойчивы в нейтральной среде, однако даже в слабокислой среде при

pH=5,5 при комнатной температуре наблюдается падение молекулярной массы со временем. Полидисперсность приближается к наиболее вероятной ($M_w/M_n = 2$) - типичной для статистического разрыва цепей. Гидролитическая устойчивость тем ниже, чем выше степень окисления. При повышении температуры скорость гидролиза в кислой среде существенно возрастает. При pH=3,5 нагревание до 60°C в течение 0,5 часа приводит к резкому снижению молекулярной массы (таблица 4).

Таблица 4 – Изменение молекулярно-массовых характеристик ДАД в растворе в процессе гидролиза при температуре 25°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

*при температуре реакции 60°C

В щелочных растворах ускоряется побочная реакция дипропорционирования альдегидных групп ДАД с образованием гидролитически не стабильных разомкнутых оксикислот (схема 8). Восстановление альдегидных групп так же приводит к образованию продуктов с низкой гидролитической устойчивостью.

Выделенный в твердом виде диальдегиддекстран после длительного хранения изменяет свои молекулярно-массовые характеристики. Особенно это

характерно для ДАД высоких степеней окисления. При этом сильно возрастает M_w и полидисперсность (рисунок 15).

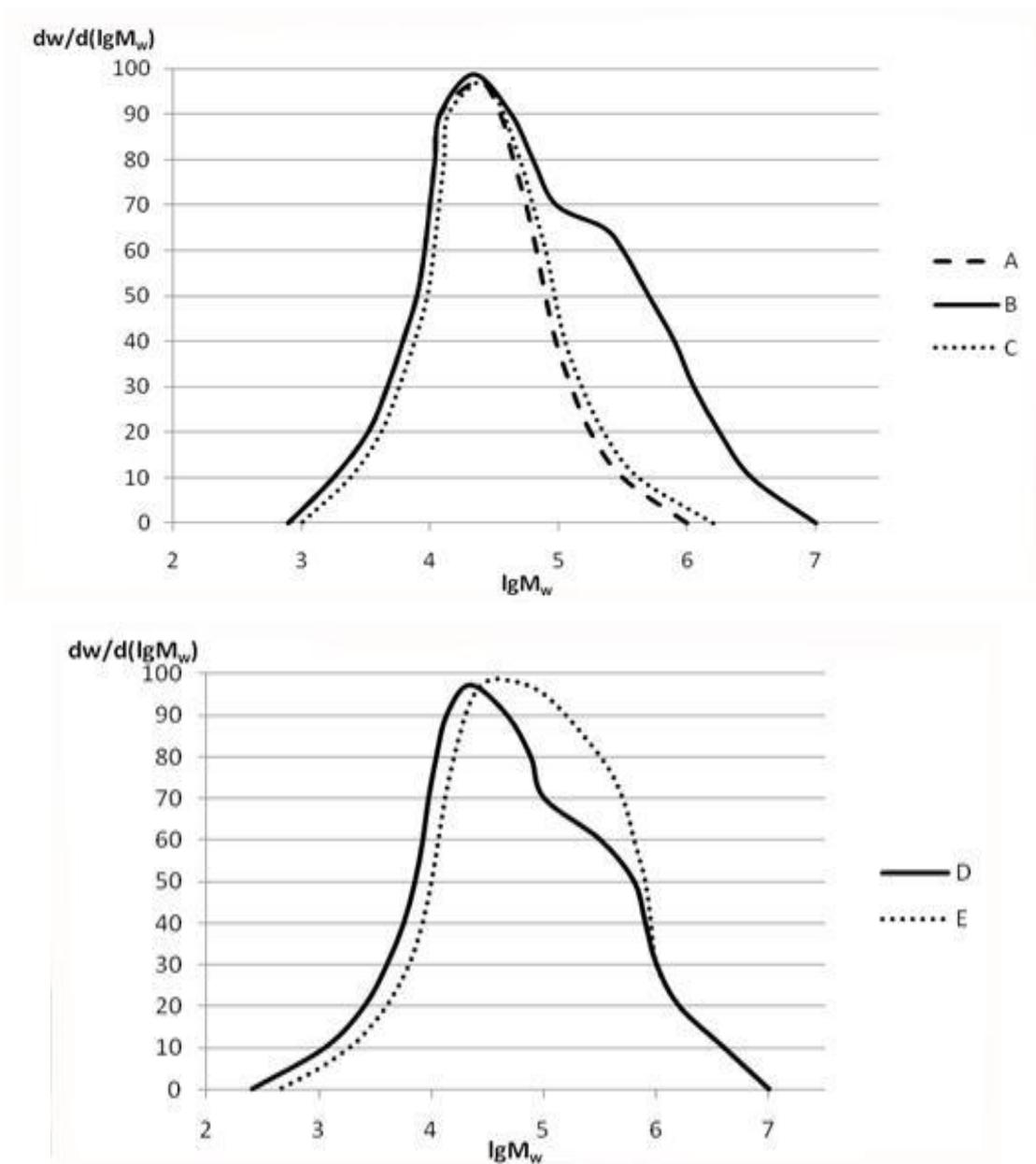


Рисунок 15 – Изменение молекулярно-массовых характеристик ДАД, выделенных в твердом виде при длительном хранении. А-ДАД, $\gamma_{ок}=15$;
 В-ДАД, $\gamma_{ок}=15$, 8 месяцев хранения; С-ДАД $\gamma_{ок}=15$, 8 месяцев хранения;
 D-ДАД $\gamma_{ок}=17,5$, 8 месяцев хранения; E-ДАД $\gamma_{ок}=84$, 8 месяцев хранения

В растворе молекулярно-массовые характеристики восстанавливаются за 30-40 часов. Сшивка ДАД в твердом виде при хранении происходит, вероятно, за счет образования межцепных лабильных полуацетальных связей,

разрушающихся со временем при растворении полимера, особенно в щелочной среде.

Таким образом, как в твердом виде, так и в растворе в водных и неводных средах окисленные звенья диальдегиддекстранов существуют в виде циклических полуацеталей. Независимо от степени окисления диальдегиддекстраны относительно устойчивы в нейтральных водных растворах. Растворение диальдегиддекстрана в сильно щелочных растворах приводит к постепенному внутримолекулярному диспропорционированию двух альдегидных групп с образованием кислотной и спиртовой функций. Относительно высокая гидролитическая устойчивость диальдегиддекстранов в слабокислой и слабощелочной средах обусловлена существованием окисленных звеньев в циклической полуацетальной форме, которые размыкаются в сильноокислых средах с быстрым падением молекулярной массы. Восстановление альдегидных групп так же приводит к образованию продуктов с низкой гидролитической устойчивостью.

Изучение молекулярно-массовых характеристик образцов ДАКМЦ разных степеней окисления методом гелепроникающей хроматографии показало, что при периодатном окислении резко снижаются молекулярная масса и полидисперсность, при этом разрыв цепи носит статистический характер, ММР сужается и приближается к Гауссовому, а полидисперсность стремится к наиболее вероятному значению $n = M_w / M_n = 2$ (таблица 5, рисунок 16).

Таблица 5 – Молекулярно-массовые характеристики ДАКМЦ

Вещество	M_w , кДа	M_n , кДа	M_w / M_n
КМЦ*	712,5	91,2	7,8
КМЦ**	941,4	117,3	8,0
ДАКМЦ*	13,3	6,0	2,2
ДАКМЦ**	15,7	7,6	2,1

* «Blanose 7MF», ** «Blanose 7H9»

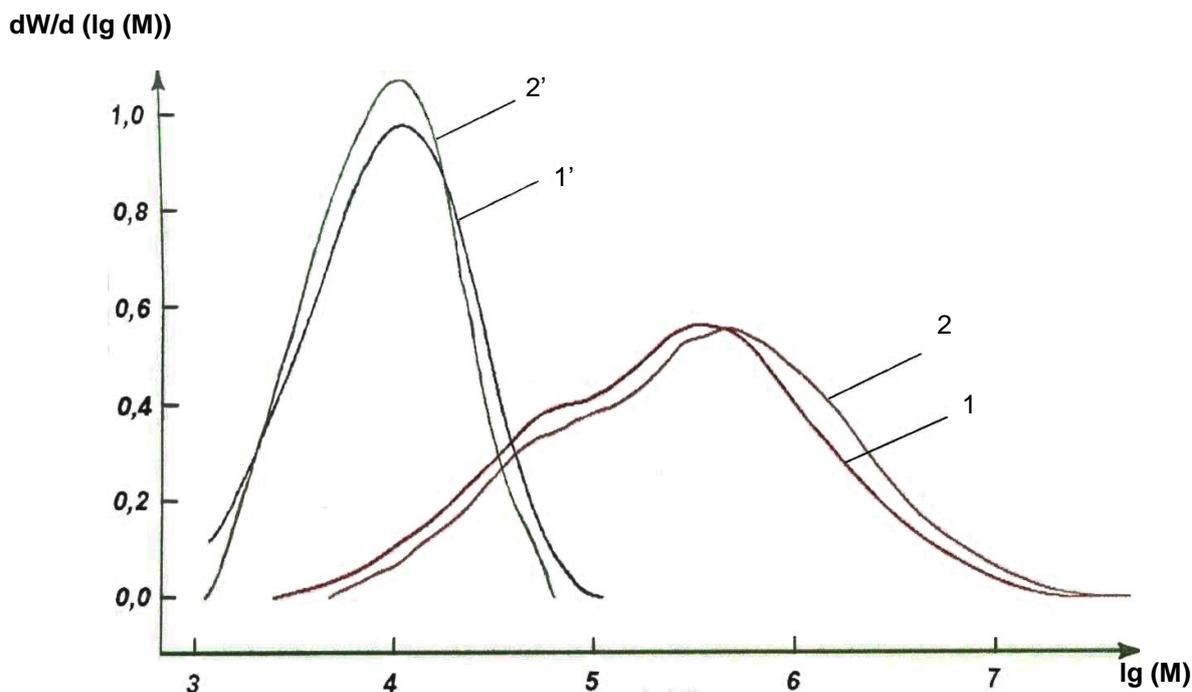


Рисунок 16 – Кривые молекулярно-массового распределения характеристик:

1 - КМЦ*, 2- КМЦ**, 1' - ДАКМЦ**, 2' - ДАКМЦ**

*-фармацевтическая «Blanose», **-нефармацевтическая «Blanose»

2.4. Фракционная неоднородность

Фракционную неоднородность полимеров изучали методом гель-проникающей хроматографии с использованием двух соединенных детекторов: рефрактометрического и мультиволнового ультрафиолетового детектора при длине волны поглощения окисленных звеньев.

В случае окисления низковязких декстранов средней молекулярной массы в гомогенных условиях фракционной неоднородности не наблюдается. Окисленные звенья равномерно распределены по фракциям полимера разной молекулярной массы.

В процессе окисления КМЦ на первой стадии образуется фракционно неоднородный полимер. Хромофорные группы содержатся в основном в низкомолекулярных фракциях, что хорошо видно на трехмерной хроматограмме (рисунок 17). На графике по оси x отложено время выхода полимера, который преобразуется в молекулярную массу, по оси y – количество хромофорных групп, а по оси z – длина волны детектирования.

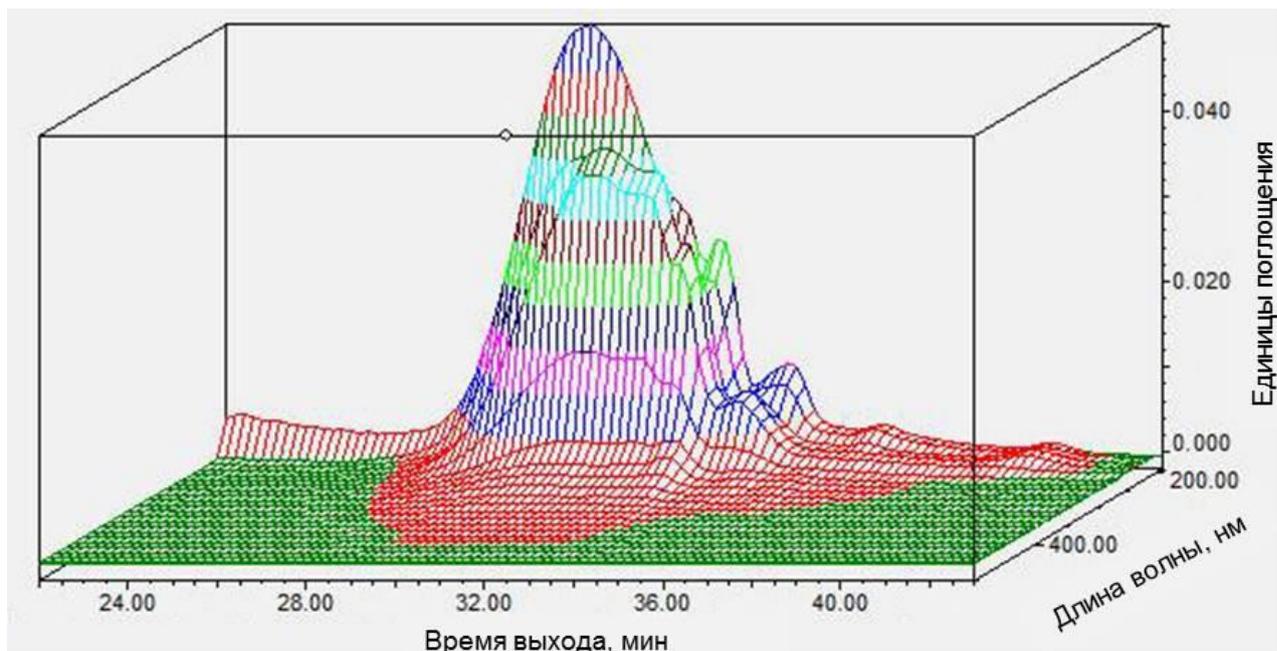


Рисунок 17 – Трёхмерная хроматограмма ДАКМЦ, $\gamma_{ок}=82\%$

Уф-спектры (рисунок 18), снятые с каждого из пиков на хроматограмме, практически идентичны. Это означает, что продукты имеют одну и ту же химическую природу. И вероятнее всего, являются фрагментами основной цепи полимера с пониженной молекулярной массой.

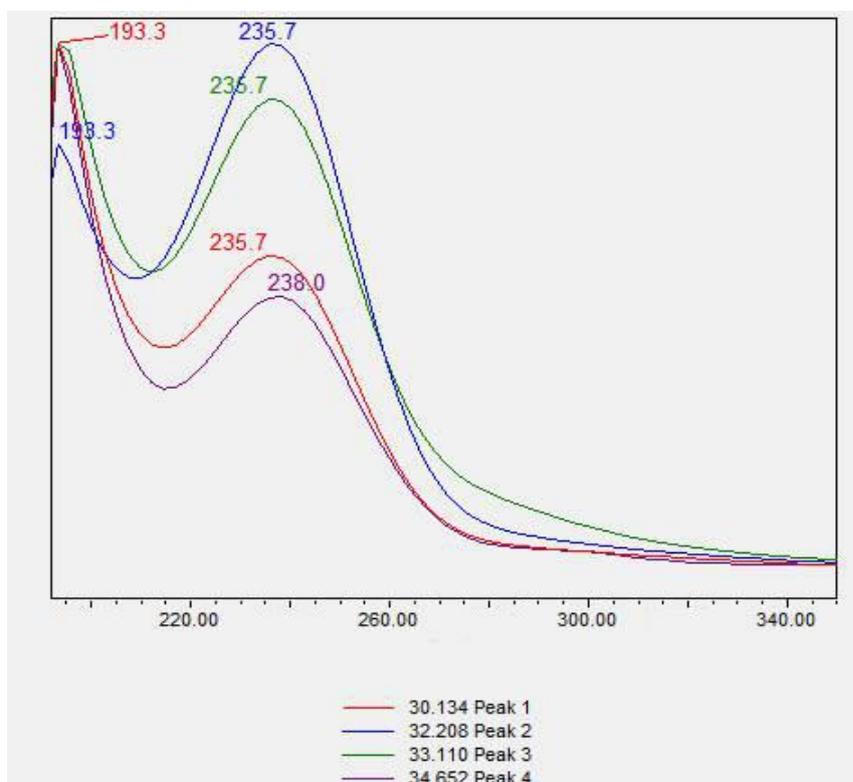


Рисунок 18 – Спектры пиков на УФ хроматограмме

Фракционную неоднородность можно проиллюстрировать, накладывая друг на друга сигналы неспецифического рефрактометрического детектора и УФ-детектора чувствительного к окисленным звеньям (рисунок 19). Таким образом, видно, что низкомолекулярные фракции содержат значительно больше окисленных звеньев.

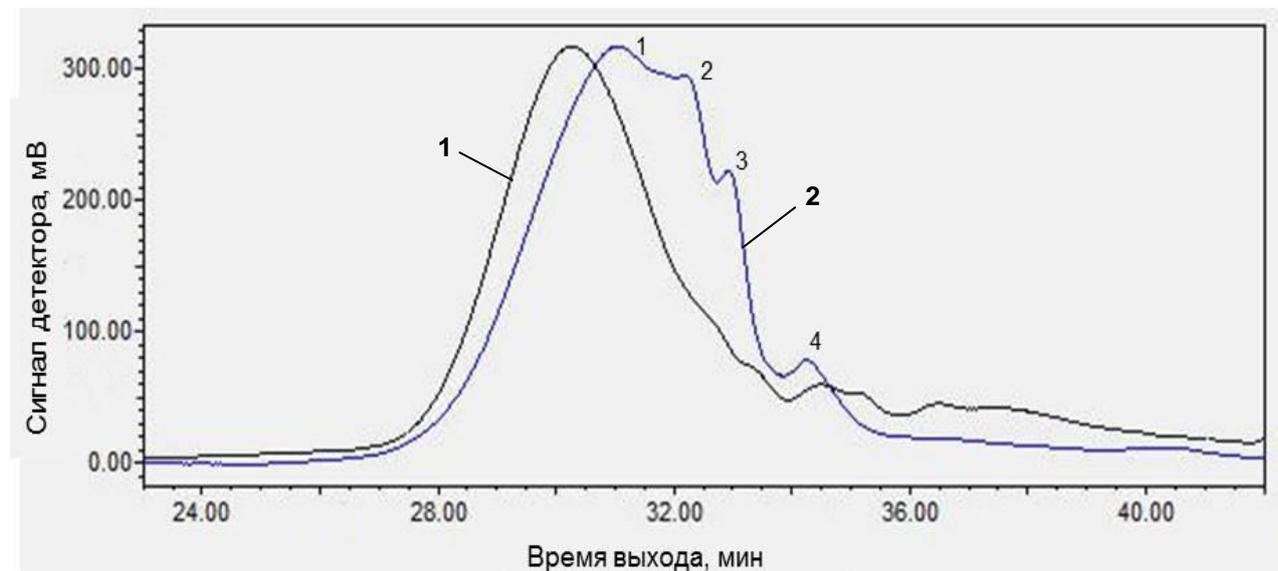


Рисунок 19 – Наложение хроматограмм, снятых с помощью РФ детектора (1) и УФ детектора при длине волны 235 нм (2)

Пересчет хроматограмм в кривые ММР подтверждают полученные результаты. 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 (рисунки 20, 21).

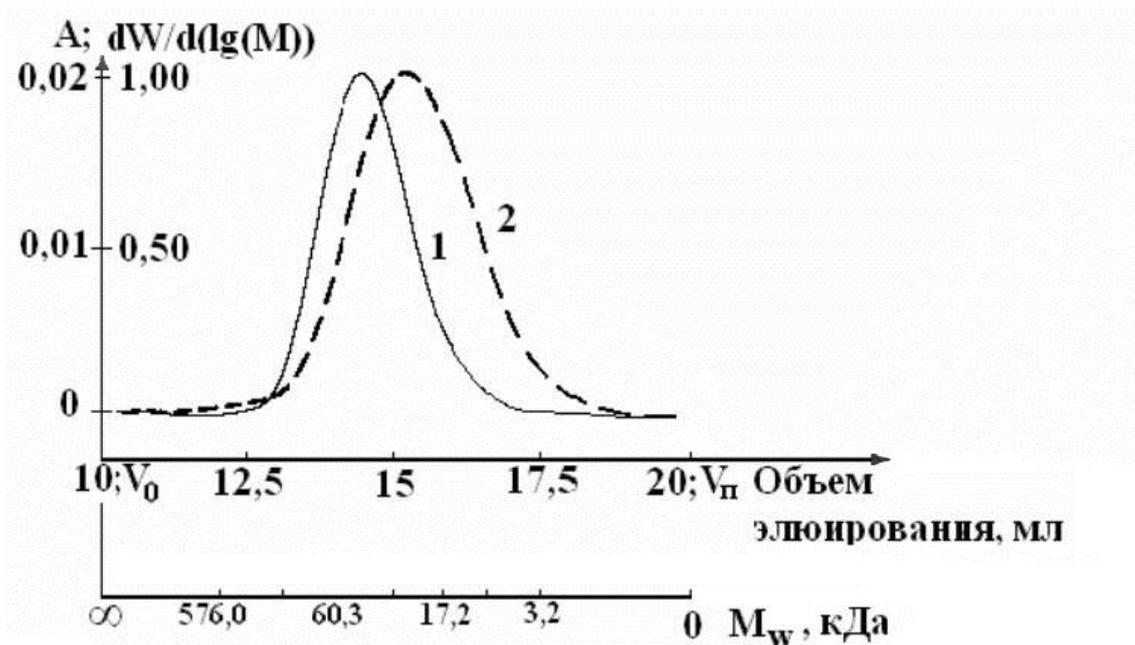


Рисунок 20 – Кривые ГПХ ДАКМЦ, полученной на первой стадии периодатного окисления: а - рефрактометрическое детектирование, б - УФ детектирование

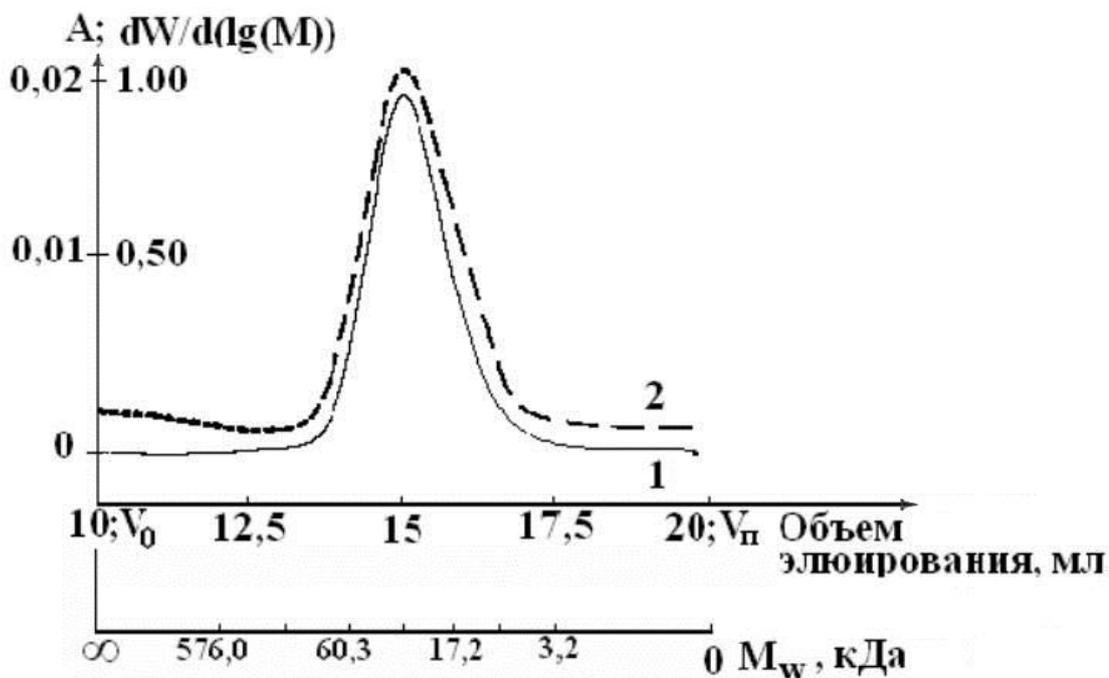
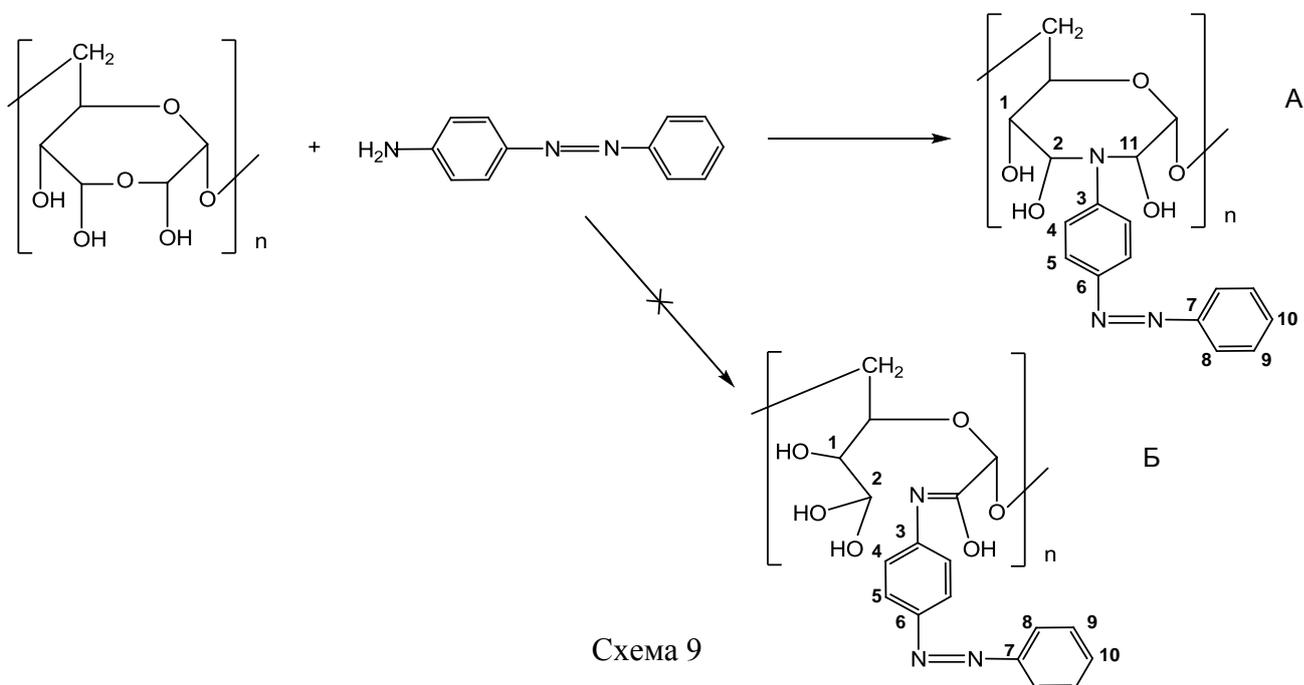


Рисунок 21 – Кривые ГПХ ДАКМЦ, полученной на последней стадии периодатного окисления: а - рефрактометрическое детектирование, б - УФ детектирование

2.5. Присоединение белков

Короткие пептиды и белки взаимодействуют с полисахаридами с образованием ковалентно-связанных продуктов, однако тип связи до сих пор остается предметом дискуссий. Наиболее реакционно-способной группой в белках и пептидах является свободная концевая аминогруппа в аминокислотах, содержащих ароматические заместители (фенилаланин, тирозин). 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 структуры образующихся соединений в работе использовали *p*-аминоазобензол в качестве модельного первичного амина. Соединение имеет высокую мольную экстинкцию и позволяет легко определить количество аминогрупп, связанных с полимером. Оказалось, что только одна молекула амина способна связываться с окисленным сахаридным звеном с образованием циклического продукта А в соответствии со схемой 9.



Сравнение инкрементных схем возможных продуктов присоединения со спектром ЯМР ¹³C полученных полимеров (рисунок 22) подтверждает образование циклического продукта А (таблица 6).

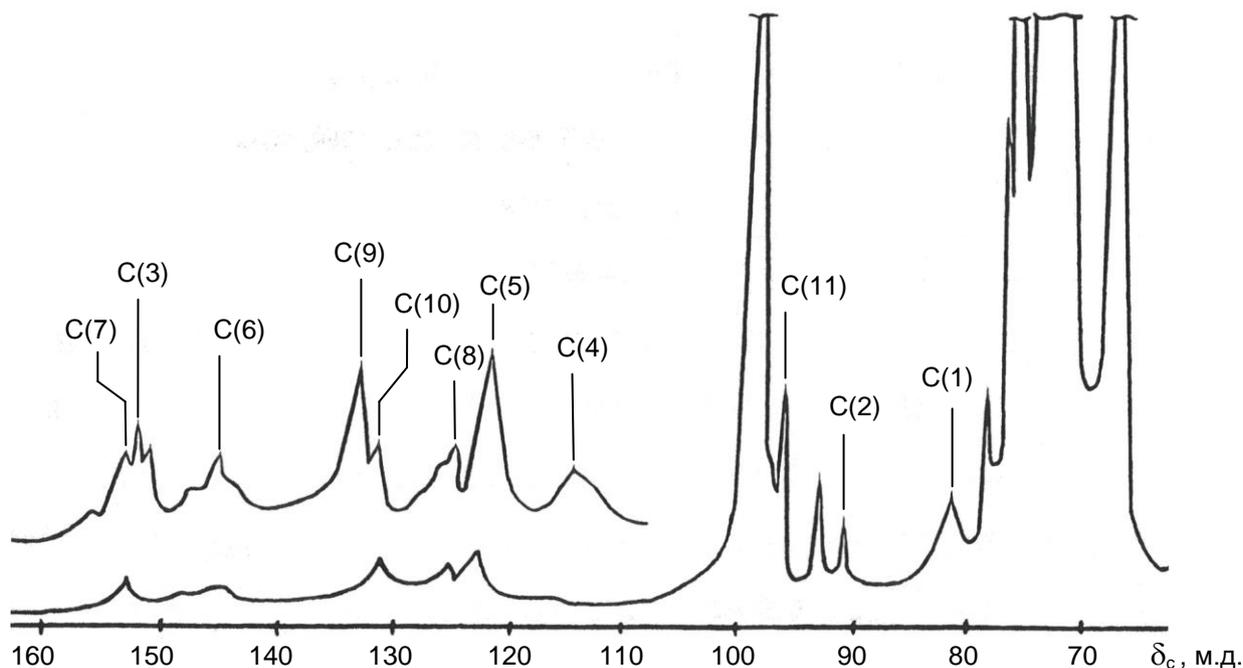


Рисунок 22 – ЯМР ^{13}C спектр продуктов присоединения п-аминоазобензала к ДАД:
1 – ДАД $\gamma_{\text{ок}} = 4,6$; 2 – ДАД $\gamma_{\text{ок}} = 3,5$

Таблица 6 – Сравнения расчетных и экспериментально найденных химических сдвигов атомов углерода в спектре ЯМР ^{13}C продуктов конденсации аминов с ДАД

Номера атомов С	Значения химических сдвигов, δ , м. д.		
	Найдено в полученном продукте	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

В УФ-спектре исчезает коротковолновая полоса поглощения аминогруппы, 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 $\varepsilon=8838 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$. Соединение структуры Б с сопряженной системой с азометиновой связью не образуется, что подтверждается отсутствием батохромного сдвига, характерного для аминогруппы в сопряжении с азо-связью, аналогичному спектру п-аминоазобензола в этиловом спирте (рисунок 23).

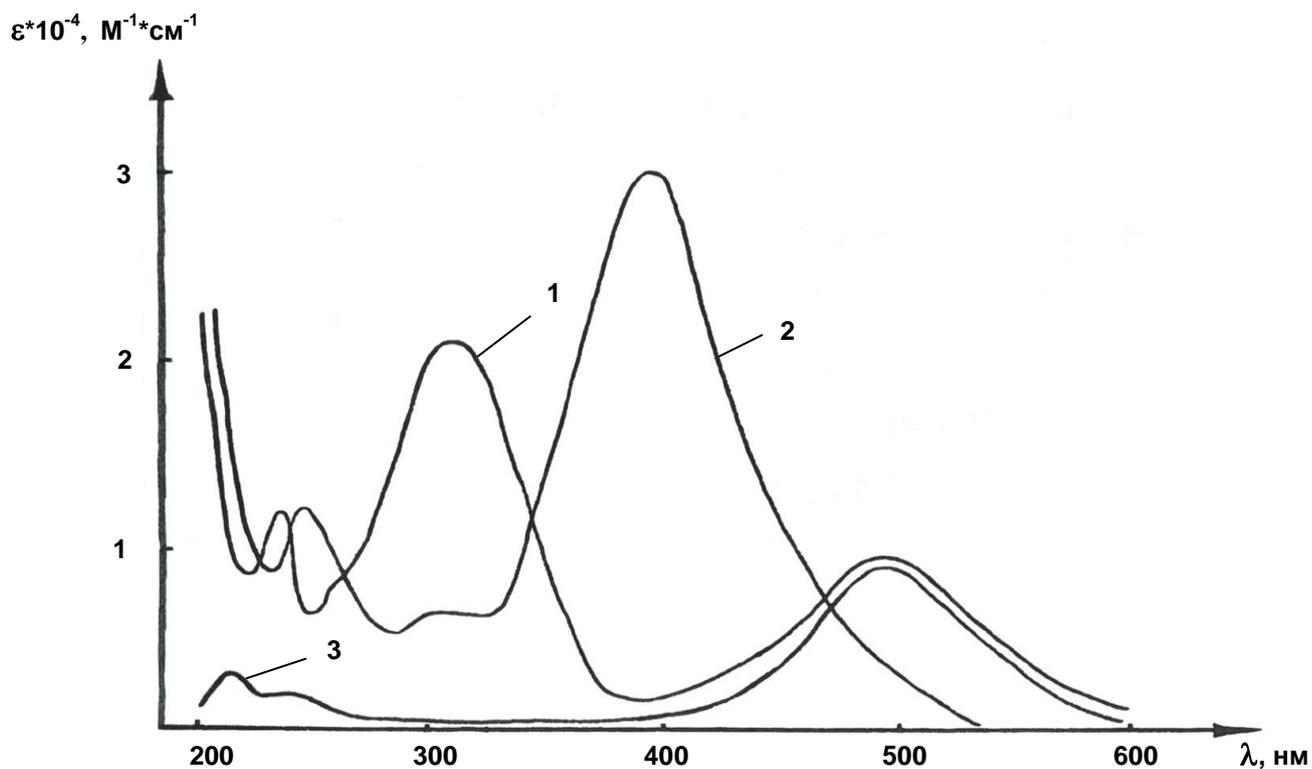


Рисунок 23 – УФ-спектры: 1 – п-аминоазобензол в 0,1М НСl; 2 – п-аминоазобензол в С₂Н₅ОН; 3 – продукт структуры А в 0,1М НСl

Для присоединения к диальдегидполисахаридам в работе использовали два физиологически активных пептида. Короткий двухцепочечный пептид инсулин с молекулярной массой $M_v=5,5$ кДа, в котором цепи связаны дисульфидным мостиком и высокомолекулярный белок - дермальный коллаген первого типа с неразрушенной ламилярной структурой и молекулярной массой около 300 кДа.

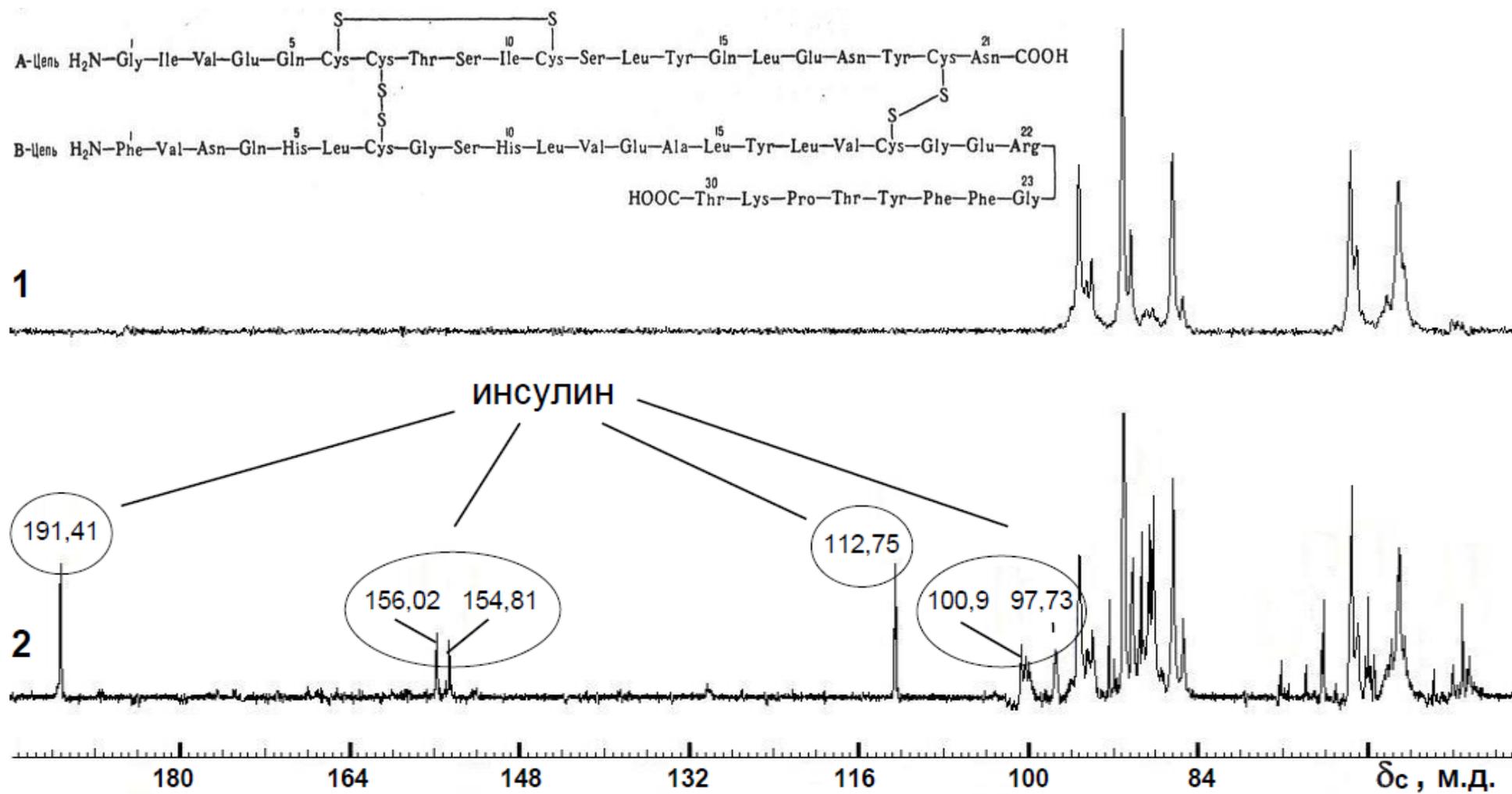


Рисунок 24 – ЯМР ^{13}C спектры: 1 – высокоокисленный диальдегиддекстран, 2 – конъюгат ДАД с инсулином

Определить точную химическую структуру продуктов присоединения не представляется возможным. Однако в спектрах полученных продуктов присутствуют сигналы заместителей аминокислотных фрагментов ковалентно-связанных с окисленными полисахаридами (рисунок 24). Контроль количества связанного пептида проводили методом УФ-спектроскопии.

2.6. Получение костнозамещающих композитов

Пластическая хирургия испытывает острый дефицит материалов, которые можно было бы использовать для замещения костной ткани, потерянной в результате травмы или заболевания. К таким материалам предъявляются жесткие требования по их биосовместимости, скорости биодеградации и способности стимулировать рост собственной костной ткани. Идеального материала до настоящего времени не создано, не смотря на интенсивные исследования, проводимые учеными во всем мире. Костнозамещающие композиты требуют тщательного контроля двух основных параметров: скорости биоразложения и остеокондуктивности, т.е. способности прорасти собственной тканью с постепенным замещением здоровой костью.

Исследуемые в работе костнозамещающие композиты включали следующие компоненты:

- ДАД, ДАКМЦ – полимер-носитель;
- Коллаген – активатор адгезии тромбоцитов;
- ГФЦФ, ГКЦФ – регуляторы скорости биоразложения;
- Инсулин – стимулятор ранозаживления;
- Гидроксиапатит (ГА) – основа неорганического матрикса костных тканей;
- Амикацин – бактерицидный антибиотик группы аминогликозидов, препятствующий гнойным инфекциям кожи и мягких тканей;
- Хондроитинсульфат - мукополисахарид, стимулирующий рост хрящевой ткани

Открытопористые образцы для испытаний получали способом в соответствии с блоксхемой представленной на схеме 10.

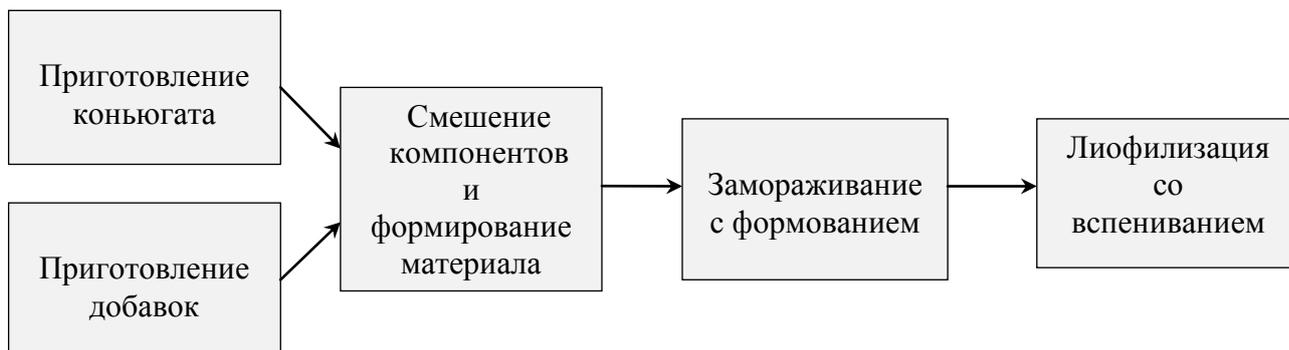


Схема 10. Блок-схема приготовления образцов для испытаний.

На первой стадии растворным способом готовили конъюгат коллагена с диальдегидполисахаридами в соотношении в соответствии с таблицей 7 на странице 83, затем его смешивали с водой, добавками, замедляющими скорость биodeградации, замораживали и лиофилизовали со вспениванием из замороженного блока. Размер и объем пор контролировали, изменяя количество воды в блоке.

Размер пор и поверхность композита определялась соотношением полимер : вода и контролировали методами атомно-силовой микроскопии и микровотографии (рисунки 25-27).

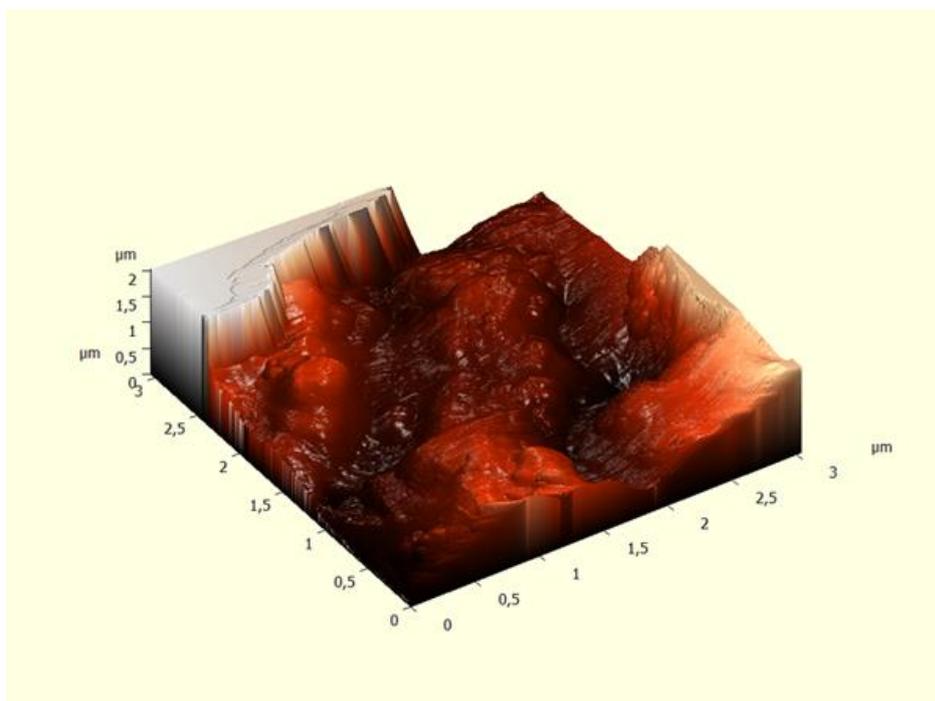


Рисунок 25 – 3D-изображение поверхности образца снятое с помощью атомно-силового микроскопа

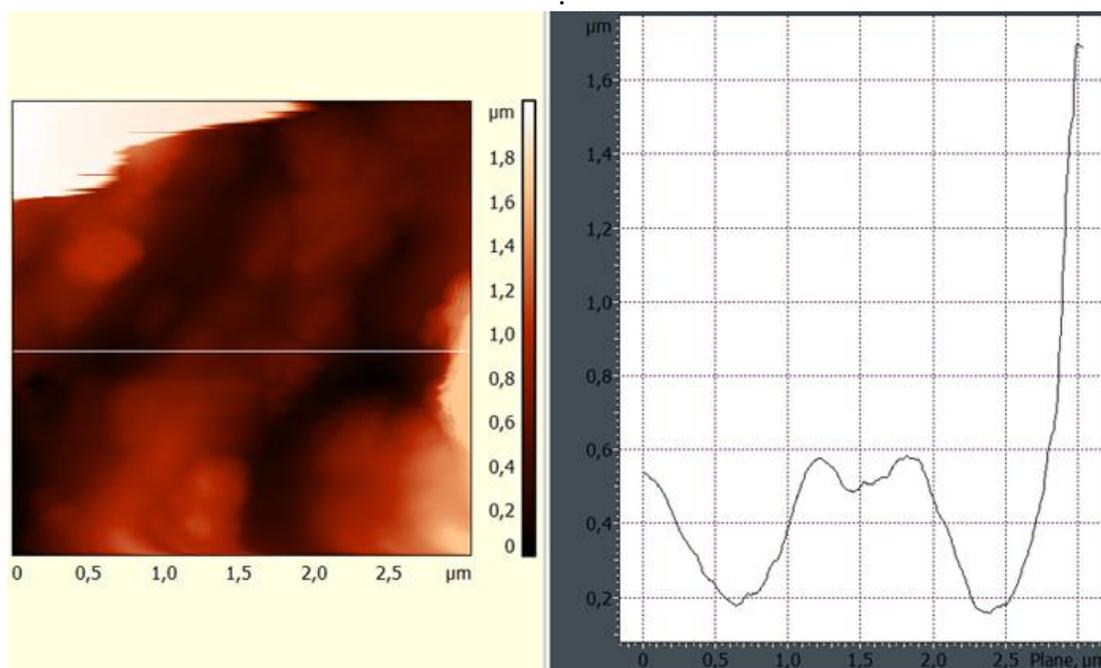


Рисунок 26 – Профиль поверхности образца

Содержание, %

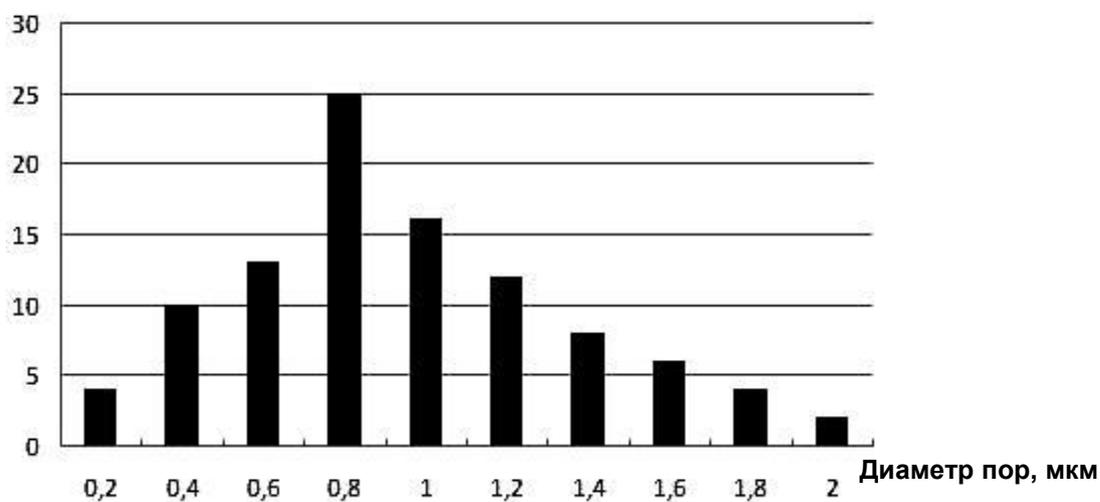


Рисунок 27 – Распределение пор по размерам в образце

Исходя из графика распределения пор по размерам (рисунок 27) таблетка преимущественно имеет поры диаметром 0,8-1 мкм, что наиболее подходит для успешной регенерации костной ткани. Изменяя количество воды в композиции, оптимизировали способ получения пористого материала с размером пор в

интервале 0,8-1,0 мкм. Такой размер пор является оптимальным с точки зрения максимальной скорости прорастания капиллярами.

Таблица 7 – Компоненты для получения костнозамещающего композита на основе ДАД, как полимера-носителя

№ образца на рис. 30	Тип коллагена Растворимый/ Нерастворимый (Р/Н)	Конъюгат		Наногидроксиапатит (НГА), мг
		Состав, носитель : коллаген	Количество, мг	
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.

2.7 Исследования скорости биodeградации *in vitro*

Скорость биodeградации *in vitro* определяется по скорости выхода L-гидроксипролина, поскольку в коллагене содержится большое количество этой аминокислоты. Метод основан на гидролитическом расщеплении раствора коллагена под действием фермента коллагеназы в присутствии кофактора,

последующем окислении продуктов хлорамином-Т и дальнейшем взаимодействии продукта с п-диметиламинобензальдегидом (схема 11).

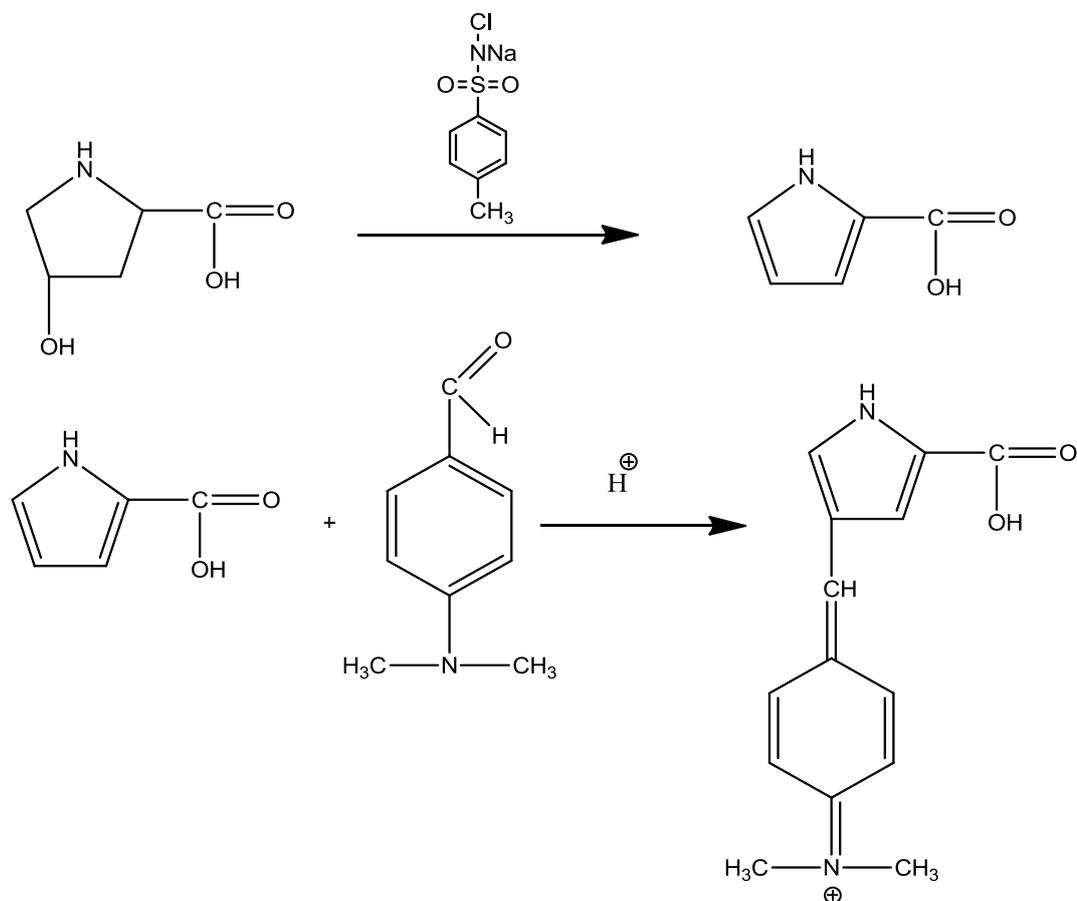


Схема 11

При этом образуется окрашенное соединение, имеющее максимум поглощения в видимой области при длине волны 558 нм (рисунок 28).

Калибровку метода производили с использованием стандартных растворов L-гидроксипролина (рисунок 29).

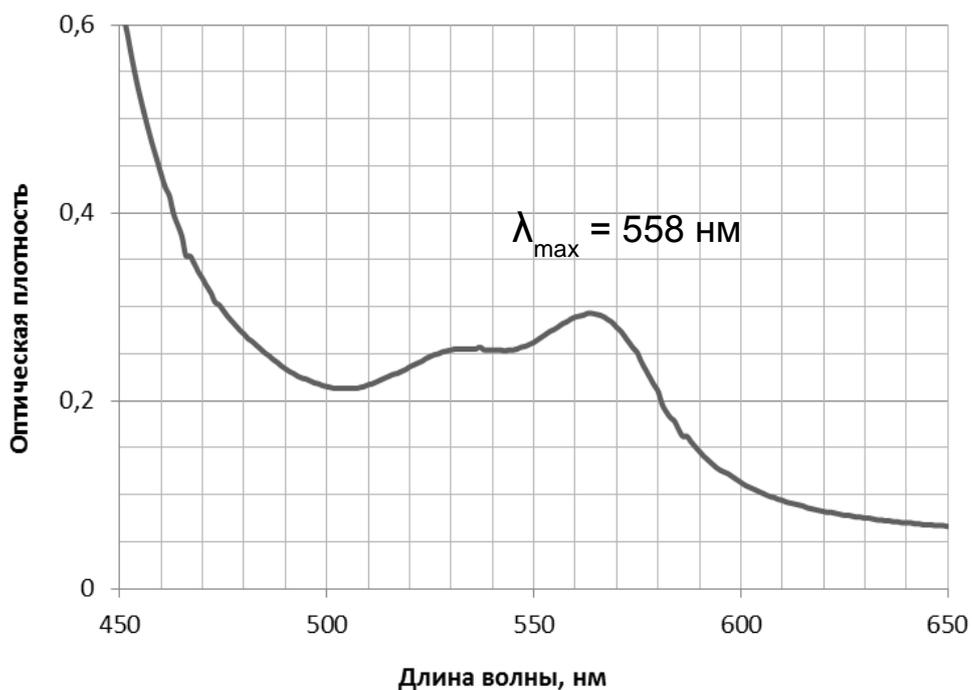


Рисунок 28 – Спектр поглощения в видимой области стандартного раствора продукта реакции пиррол-2 карбоновой кислоты и п-диметиламинобензальдегида

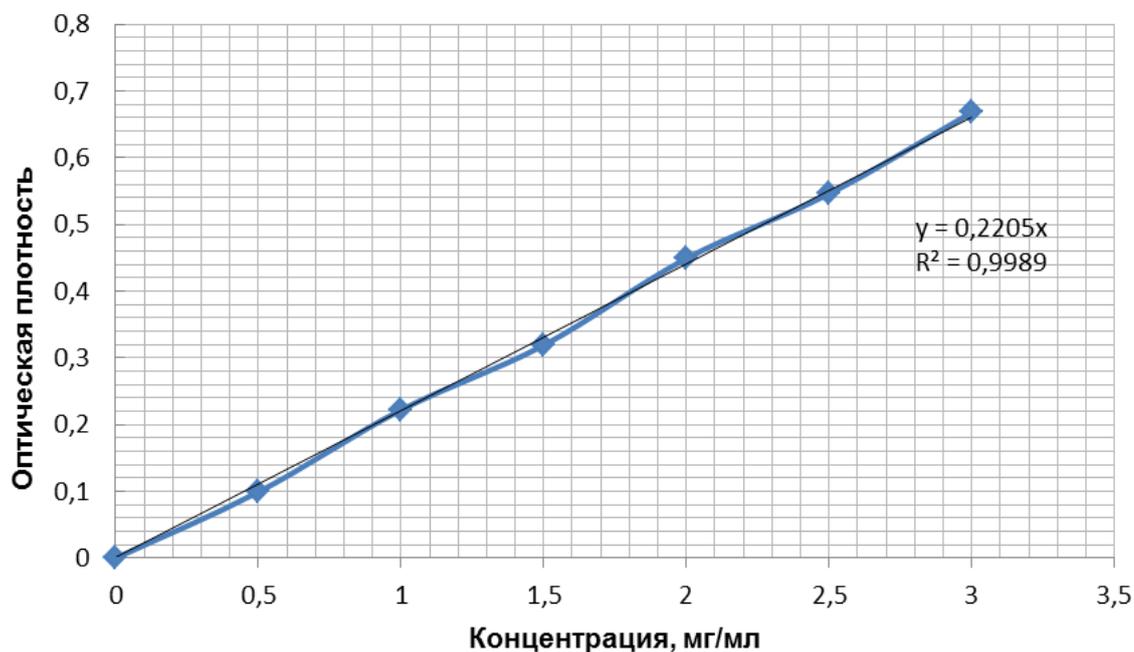


Рисунок 29 – Калибровочная кривая

Оптическая плотность линейно зависит и не наблюдается отклонений от закона Ламберта-Бугера-Бера вплоть до концентрации 3 мкг/мл.

На основании этого метода разработаны условия для измерения скорости биодegradации *in vitro*. Биодegradация коллагена под действием коллагеназы требует 5 суток (рисунок 30).

Концентрация L-оксипролина линейно меняется в течение 150 часов при ферментативном гидролизе негликозилированного коллагена. Использование ДАД в качестве ингибитора биодegradации позволяет втрое снизить скорость ферментативного гидролиза, однако этого недостаточно для костнозамещающих материалов. Высокоокисленная ДАКМЦ снижает скорость в 10 раз. Наибольший эффект достигнут с использованием гекса-[п-карбоксилфенокси]циклотрифосфазена. Он снижает скорость биодegradации более, чем в 100 раз.

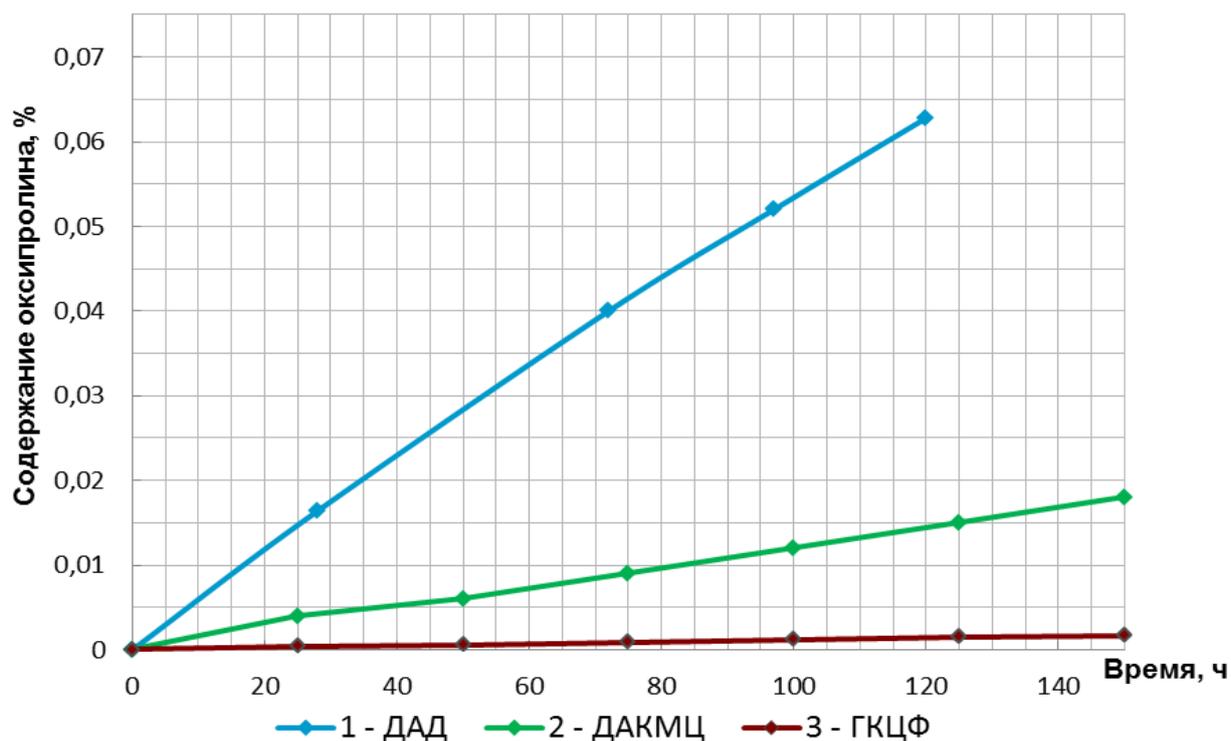


Рисунок. 30 – Линейное изменение концентрации L-оксипролина в течение 150 часов при ферментативном гидролизе коллагена в опытах *in vitro*

2.8 Изучение в опытах *in vivo* скорости биодegradации полимерного конъюгата коллагена с диальдегидполисахаридами

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 композитного материала для замещения кости. Этот выбор напрямую зависит от того, какой из механизмов является доминирующим в процессе биodeградации. Скорость биodeградации в работе определяли методом *in vivo* путем подкожной имплантации образца в спинную область крысы (рисунок 31).

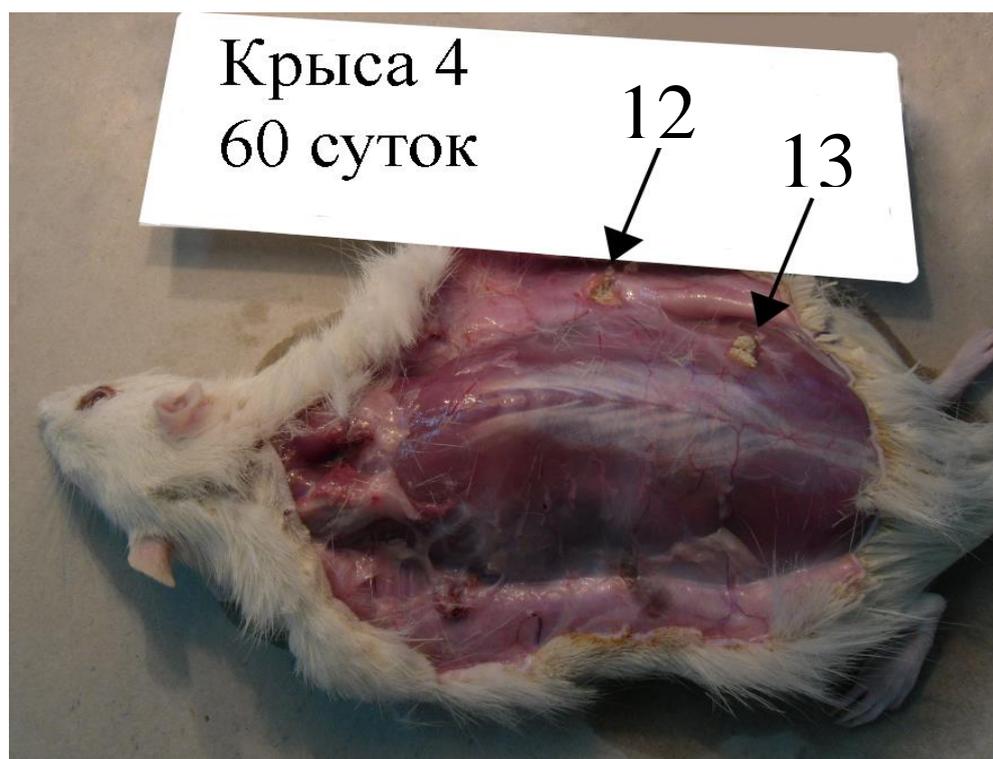


Рисунок 31 – Пример подкожной имплантации. 12, 13 – номера образцов

Оказалось, что биodeградация коллагена ковалентно связанного с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой сильно замедлена, причем в процессе

имплантации не наблюдается усиления воспалительной реакции на первой стадии и нагноения на второй.

Регуляторы скорости биodeградации на основе циклофосфазенов 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 – 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 биodeградации даже в отсутствие специальных ингибиторов ферментативного гидролиза. Интенсивность процесса оценивали по уменьшению размера образцов после имплантации (таблица 8, рисунок 32).

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 протеолитических ферментов.

Изучение аутопсийного материала после выведения животных из опыта через 60 дней показало следующее: полностью биodeградировали образцы № 5, 6, 7, 8; частично биodeградировали образцы № 2 (46%), 4 (49%), 9 (8%), 10 (43%), 11 (1 - 46%, 2 – 7%), 13 (26%); не биodeградировали образцы № 1, 3.

Таблица 8 – Образцы после биодеградации

№ образца	Диаметр образца после эксперимента, мм	Биодеградация, %
1	7,5	0
2	4,0	46
3	7,9	0
4	3,8	49
5	-	100
6	-	100
7	-	100
8	-	100
9	6,8	8
10	4,2	43
11	4,0	46
12	7,0	7
13	5,5	26

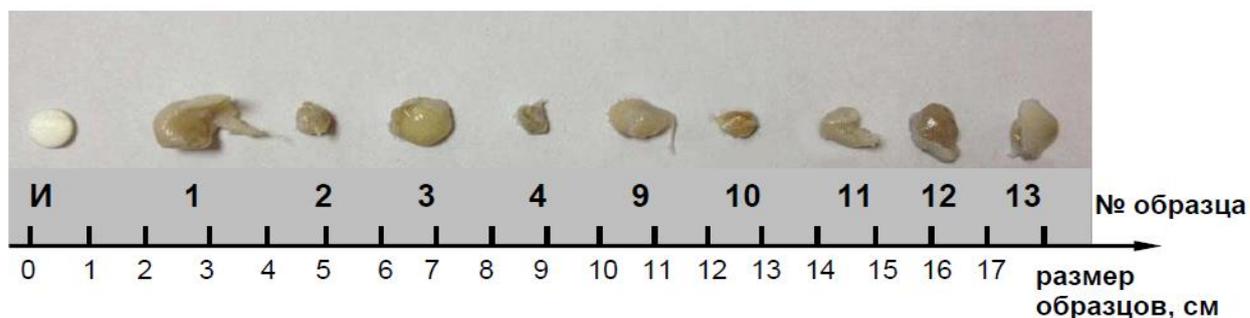


Рисунок 32 – Изменение размера образцов пористого композитного материала при подкожной имплантации. И – исходный образец (7,5 мм). Состав образцов см. в таблице 7

2.9 Исследование способности имплантата вызывать рост клеток и их дифференциацию в клетки костного пути регенерации

Для оценки биологического влияния полисахаридного композита были использованы клетки пульпы третьих моляров (зубов мудрости) человека. По

своим морфологическим и фенотипическим свойствам эти клеточные популяции аналогичны мезенхимальным стволовым клеткам человека, поскольку они обладают свойством клоногенности, способны пролиферировать как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, характеризуются мультипотентностью направлений дифференцировки, то есть могут превращаться в разные и не обязательно в костные клетки. В опытах по определению активности щелочной фосфатазы было показано, что полисахаридный композиционный материал активно стимулирует пролиферацию клеток Th-1. Стимулирующее воздействие (более 200% от контроля) наиболее выражено при концентрации суспензии 100 мкг/мл. Кроме того, эта концентрация способствует дифференцировке клеток Th-1 в остеогенном направлении, то есть в направлении превращающем их в клетки, формирующие костную ткань.

Щелочная фосфатаза – специфический фермент вырабатываемый живыми мультипотентными мезенхимальными клетками предшественниками клеток костной ткани. Это индикатор их дифференцировки в остеогенном направлении. Различие в характере экспрессии щелочной фосфатазы показывает, что воздействие диальдегидполисахаридного композита приводит к проявлению гетерогенности в популяции клеток Th-1, то есть они начинают дифференцироваться. Возрастание активности щелочной фосфатазы проявляется в тех же областях, где наблюдается формирование кальцификатов, что свидетельствует о стимуляции дифференцировки клеток именно в остеогенном направлении. Наряду с этим появляются области неокрашенных клеток, по-видимому, утративших свойство мультипотентности, но не проявляющих еще характерных признаков дифференцировки в остеогенном направлении.

Фотометрическое определение степени кальцификации клеток (рисунок 33 (1)) и уровня экспрессии щелочной фосфатазы (рисунок 33 (2)) позволило провести численное сравнение этих величин в опыте и в контроле.

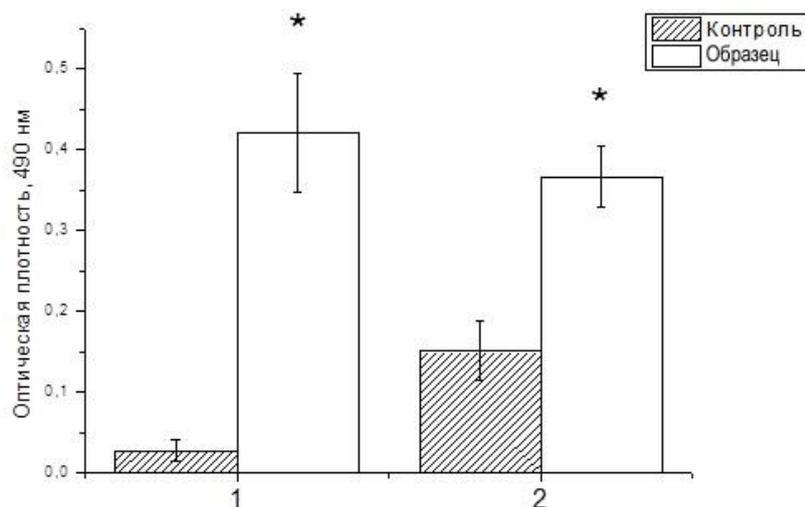


Рисунок 33 – Степень кальцификации клеток (1) и активность щелочной фосфатазы (2) в среде с диальдегидполисахаридным образцом и в контроле

Таким образом, исследование биологической активности диальдегидполисахаридного композита, проведенное с использованием клеток пульпы зуба человека, показало, что исследуемый образец оказывает ярко выраженное стимулирующее воздействие на остеогенную дифференцировку и пролиферативную активность мультипотентных клеток мезенхимального ряда.

2.10 Способность полисахаридного пористого имплантата прорасти костной тканью в опыте *in vivo* (остеокондуктивные свойства)

Остеокондуктивные свойства полученных композитов изучали в опытах *in vivo*, используя модель критического костного анастомоза большеберцовой кости крысы. В качестве эталона сравнения использовали аналогичные блоки из деминерализованного костного матрикса (ДКМ). Исследуемый образец помещали в одну из задних конечностей, а материал сравнения – во вторую.

Содержание компонентов в образцах подбирали на основании результатов подкожной имплантации. Инсулин, ковалентно-связанный с полисахаридом, добавлен как пролонгированный стимулятор ранозаживления;

коллаген, как активатор тромбоциты; амикацин – в качестве антибиотика, препятствующего локальному нагноению (таблица 9).

Блок полисахаридного костнозамещающего материала закрепляли в пятимиллиметровый анастомоз (протяженный дефект) большеберцовой кости крысы при помощи карбонового стержня. Блок эталона сравнения закрепляли в аналогичный анастомоз на второй лапе крысы. За ранозаживлением и остеокондуктивными свойствами материала наблюдали при помощи сканирующего рентгеновского томографа марки SkyScan.

Томографическое исследование производили на 14 и 30 сутки эксперимента. На 60 сутки животных выводили из эксперимента и определяли остеокондуктивные свойства материала методом рентгеновской денситометрии.

Таблица 9 – Состав образцов на имплантацию в диастаз

Компоненты, содержание %					Наличие воспаления/ нагноения (В/Н)
ДАД \ ДАКМЦ (*)	Коллаген	Инсу- лин	Амика- цин	Ингибитор биodeградации и стимулятор роста хрящевой ткани	
33,2	34,2	1,5	7,8	ГФЦФ 23,3	В,Н
37,0	26,3	1,1	5,5	Хондроитин сульфат 30,1	-
83,9	12,6	0,6	2,9	-	-
69,4	23,5	1,2	5,9	-	-
82,2	14,5	-	3,3	-	-
-	66,7	-	-	ГКЦФ 33,3	В, Н
49,9*	41,3	1,4	7,4	-	-
66,3*	27,0	1,1	5,6	-	-

В качестве контроля был использован образец, содержащий только диализованный и лиофилизированный коллаген «СИНАП».

Процесс воспаления завершился на седьмые сутки и через 30 дней материал начинал замещаться соединительной тканью с образованием тканой капсулы. Через 60 суток материал частично рассасывался и обрастал слоем надкостницы с поверхности с той же скоростью, что и костный матрикс. Это первая стадия образования костной мозоли при срачивании переломов (рисунок 34), то есть наблюдалось выраженное срачивание кости.



Рисунок 34 – Снимок анастомоза большеберцовой кости крысы, сделанный с помощью рентгеновского томографа через 60 суток (А – с опытным образцом полисахаридного композита в анастомозе, Б – с образцом ДКМ)

Необходимо заметить, что как 3 мм, так и 5 мм костный анастомоз является избыточным по своим размерам и соответствует отсутствию 10 – 15% общей длины кости. Без применения костнозамещающего материала, такое повреждение кости срастись не может ни за какой срок.

У всех экспериментальных животных на 30 или 60 сутки после операции не отмечалось образования регенерата и костного сращения.

Имплантированный контроль деминерализованный костный матрикс ДКМ полностью резорбировался. Результаты исследования показали, что введение образцов, содержащих наногидроксиапатит, вызывает нагноение на второй стадии ранозаживления. Присутствие производных фосфазенов в составе композита 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. Полученные вещества могут быть рекомендованы для использования в качестве хорошей основы для костнозамещающих материалов.

ВЫВОДЫ

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

2. Обнаружено резко замедленное окисление диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы, по сравнению с диальдегиддекстраном.

3. Показано, что молекулярная масса полисахаридов падает 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 диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой.

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

8. Получены новые биокomпозиционные материалы для замещения костной ткани, содержащие физиологически активные полимеры, наполнитель-наногидроксиапатит, и замедлители скорости биodeградации фосфазенового типа, антибиотик.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Описание свойств исходных соединений, вспомогательных веществ и растворителей

3.1.1 Исходные соединения

1. **Стандартный кровезаменитель Полиглюкин «Декстран»** (ОАО «КРАСФАРМА») – прозрачный раствор. Раствор для инфузий, 400 мл 6 % раствор декстрана с $M_w=50\div 70$ кДа в изотоническом 0,9 % растворе NaCl. Использовали без дополнительной очистки.

2. **Na-Карбоксиметилцеллюлоза** (Ashland, США) Марка “Blanose” 7MF – порошок светло-желтого цвета. Линейный полимер, производное целлюлозы. Степень карбоксиметилирования – 82 %, $M_w=712$ кДа. Использовали без дополнительной очистки.

3. **Na-Карбоксиметилцеллюлоза** (Ashland, США) Марка “Blanose” – порошок светло-желтого цвета. Линейный полимер, производное целлюлозы. Степень карбоксиметилирования – 65 %, $M_w=2297$ кДа. Коэффициент полидисперсности (M_w/ M_n) = 1,5437. Использовали без дополнительной очистки.

4. **Коллаген косметический дермальный первого типа «СИНАП»** («СИНАП») изготовлен из бычьих шкур кислотным гидролизом согласно ТУ 9158-003-18123217-05 – бесцветная вязкая слегка опалесцирующая жидкость. Водородный показатель $pH=7,3$. Массовая доля сухого вещества – 0,8%. Массовая доля коллагена в сухом веществе по содержанию оксипролина – 98,1%, определенная по ГОСТ-Р 50207-92 (ИСО 3496-78). Общее микробное число - 0 клеток/г продукта. Количество дрожжевых и плесневых грибков в продукте - 0 клеток/г. Стерилизован фильтрованием, очищен диализом против дистиллированной воды.

6. **Гидроксиапатит**, химическая формула: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (SANGI CO., LTD.) – белый порошок, без запаха, химически устойчив, не горюч, может

вызвать раздражение глаз или дыхательных путей. Использовали без дополнительной очистки.

8. Инсулин свиной, лиофилизированный (ООО «Биолот») – белый порошок. Гормон пептидной природы. Молекулярный вес – 5,8 кДа, рН: 2,0 – 2,2. Чистота не менее 98%, Остаточная влажность - не более 5%. (электрофоретическая). Выделение: кислотно-спиртовая экстракция, дальнейшая очистка – хроматографическая. Биологическая активность: 24,5 ЕД/мг. Остаточное содержание цинка – менее 0,8%. Срок годности 1 год. Условия хранения: - 20°С. Использовали без дополнительной очистки.

9. Инсулин человеческий (ООО «Биолот») Серия 020410 – белый порошок. Серия 020410. Содержание цинка 0,41% в пересчете на сухое вещество. Микробиологическая чистота – категория 1,2 Б. Биологическая активность – 29,0 МЕ/мг. Использовали без дополнительной очистки.

3.1.2 Вспомогательные вещества

1. Амикацин (ОАО «Красфарма») Партия №4602521001052, годен до 04/12 – белый порошок. Сильный бактерицидный аминогликозидный антибиотик широкого спектра действия. Использовали без дополнительной очистки.

2. Гекса-[п-формилфеноксид]циклотрифосфазен – светло-желтые игольчатые кристаллы. Был получен в ТГФ, осажден в C_2H_5OH , высушен в сушильном шкафу при 40-50°С. $T_{пл.} = 156,0^{\circ}C$ (была определена с помощью столика Кофлера). Использовали без дополнительной очистки.

3. Гекса-[п-карбоксилфеноксид]циклотрифосфазен – белое твердое вещество. Растворим в диметилсульфоксиде и других апротонных биполярных растворителях, в пиридине. Использовали без дополнительной очистки.

4. Коллагеназа – протеолитический фермент. Collagenase Sigma Cell Culture, Type IA, Sigma Aldrich. Активность CDU 207 ЕД/мг, FALGPA 0,54 ЕД/мг.

5. Натрий йоднокислый мета (реактив для медицинского применения, ООО «Вектон») – белый кристаллический порошок. Массовая доля основного вещества – не менее 98%. Химическая формула: NaIO_4 . Использовали без дополнительной очистки.

6. Борная кислота (х.ч., ООО «Русхим». ГОСТ 9656-75, партия 59, дата изготовления 06.2011 – белый кристаллический порошок. Использовали без дополнительной очистки.

7. Натрий тетраборнокислый (ч., ООО «Русхим») ГОСТ 4199-76 изм 1-2, партия 64, дата изготовления 06.2011– белый кристаллический порошок. Использовали без дополнительной очистки.

8. Гидроксид натрия (ч.д.а., ООО «Лаверна»). $T_{\text{пл}} = 400^\circ\text{C}$; $d^{20} = 2,12$. Использовали без дополнительной очистки.

9. Натрия боргидрид (Acros Organics) – бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в воде и полярных органических растворителях. Использовали без дополнительной очистки.

10. Инулин (NOWFOODS, 395 S. GlenEllynRd. Bloomingdale, IL 60108, США) – белый мелкодисперсный порошок.

11. Хондроитин сульфат (ООО Медицинский центр «Эллара») – белая, пористая, лиофилизированная, уплотненная в таблетку масса. Использовался без дополнительной очистки.

12. Крахмал картофельный (ООО «РЕАХИМ» ГОСТ 7699-78) – белый порошок. Линейный полисахарид. Использовали без дополнительной очистки.

13. Калий бромистый (Merck, Германия). Для ИК спектроскопии, серия ВО 373307 931 – бесцветное кристаллическое вещество. $T_{\text{пл}} = 748^\circ\text{C}$. Бромид калия не поглощает ИК-излучение в достаточно широком интервале длин волн (от 0,25 мкм до 25 мкм). Использовали для изготовления таблеток для измерения инфракрасных спектров.

14. Лимонная кислота (ч., ООО «Русхим») ГОСТ 3652-69 – белый кристаллический порошок. Использовали без дополнительной очистки.

15. Натрий уксуснокислый (ч., ООО «Русхим». ГОСТ 199-78 изм 1-2 – белый кристаллический порошок. Использовали без дополнительной очистки.

16. Хлорамин-Т (П-толуолсульфамид натрия, 3-водный) (Ph Eur) стандарт Рапгас 142323. Массовая доля основного вещества: 98,35%. рН 5% водного раствора – 9,76. Использовали без дополнительной очистки.

17. L-гидроксипролин (ч.д.а., ЗАО «Вектон») — белый кристаллический порошок, иминокислота. Использовали без дополнительной очистки.

18. Кислота хлорная (х.ч., ООО «Реахим»). Плотность – 1,76 г/см³. Использовали без дополнительной очистки.

19. Стандарт-титр натрия гидроокись 0,1н (ООО «Баум-Люкс») ТУ 2642-002-96994494-08.

20. Стандарт-титр йод 0,1н. (ООО «Баум-Люкс») ТУ 2642-001-33813273-97. Использовали без дополнительной очистки.

21. Стандарт-титр натрий серноватистоокислый 0,1н. (ООО «Баум-Люкс») ТУ 2642-002-96994494-08. Использовали без дополнительной очистки.

3.1.3 Описание свойств растворителей

1. Дейтерированная вода D₂O (ООО «Астрахим») МДОВ-99,93; дата изготовления: февраль 2010 – прозрачная жидкость без цвета и запаха. $T_{пл.} = 3,81^{\circ}\text{C}$ (276.97 К), $T_{кип.} = 101,43^{\circ}\text{C}$ (374.55 К), $\eta = 0,00125$ Па·с (0.0125 пз) при 20°C. Использовали без дополнительной очистки.

2. Дейтерированный диметилсульфоксид ДМСО-D₆ (ч.д.а., ООО «РЕАХИМ») – вязкая, прозрачная жидкость почти без запаха. Важный биполярный апротонный растворитель. Удобный растворитель для ЯМР спектроскопии благодаря высокой растворяющей способности, простоте собственного спектра, а также стабильности в области высоких температур. $T_{кип.} = 189^{\circ}\text{C}$ (760 мм. рт. ст). $n_d^{20} = 1,004$. Использовали без дополнительной очистки.

3. Диметилсульфоксид (х.ч., ООО «Лаверна») ТУ 6-09-3818-89, партия 10, дата изготовления 06.2011. $T_{\text{кип}} = 189^{\circ}\text{C}$ (760 мм.рт.ст). $T_{\text{пл}} = 18.5^{\circ}\text{C}$. Очищали перегонкой в вакууме водоструйного насоса.

4. Н-пропиловый спирт (х.ч., ООО «Баум-Люкс») ТУ 2632-106-4449379-07. Дата изготовления 06.2011. Коэффициент преломления $1,3855 \pm 0,0002$, плотность при 20°C – $0,807-0,805$ кг/л, температура кипения при 760 мм.рт.ст.: $97-98^{\circ}\text{C}$. Использовали без дополнительной очистки.

5. Изопропанол (х.ч., ООО «Лаверна») ТУ 2632-009-0020778702, температура кипения – 82°C (760 мм.рт.ст.). Использовали без дополнительной очистки.

6. Трисгидроксиметиламинометан –ApliChem Apl-A2264,0500. Для молекулярной биологии. Температура плавления $168-173^{\circ}\text{C}$. Часто используется для приготовления буферных растворов. Использовали без дополнительной очистки.

3.2 Физические и биологические методы исследования

3.2.1 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Химическое строение синтезированных полимеров исследовали с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса на ядрах ^1H и ^{13}C .

Спектры ^{13}C ЯМР образцов снимали из растворов полимера в ДМСО- D_6 , а так же из 1% раствора NaOH в D_2O на ЯМР-спектрометре СХР-200 (РХТУ им. Менделеева) в режиме тотального подавления по протонам при 50,32 МГц и 297 К, а так же на спектрометре Bruker Avance 600 (ИНЭОС РАН) с рабочей частотой 150,94 МГц при температуре 297 К в том же режиме.

Приготовление образцов.

Навеску вещества 0,005 г растворяли в 0,5 мл дейтерированного растворителя. Полученный раствор с помощью вытянутого капилляра переливали в ампулу, так чтобы высота раствора в ампуле составляла не менее

4 см. Анализ спектров проводили с помощью программного обеспечения ACD Labs 12.0.

3.2.2 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса в твердом теле

Спектры ЯМР на ядрах углерода ^{13}C регистрировали в режиме с кросс-поляризацией с вращением под магическим углом на приборе Varian Unity Inova AS 500 (Центр твердотельной ЯМР-спектроскопии ИХХС им. А.В. Топчиева РАН). Спектры снимали на рабочей частоте 125,69 МГц. Величина импульса 2,1 мкс, время накопления – 1,5 мс, интервалами между импульсами 2 секунды, контактное время 2 мс. Значение магического угла: $57^{\circ}28'$, частота вращения образца 15 кГц. Количество накоплений - 1600 сканов.

3.2.3 Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием

Исследования химического строения окисленных звеньев в образцах диальдегидполимеров проводили с помощью инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием. ИК-спектры снимали на ИК–Фурье спектрометре фирмы “Nicolet” (США) “IR-380” в области от 400 до 4000 см^{-1} с разрешением 2 см^{-1} при комнатной температуре в режиме просвечивания из таблеток в KBr.

Для обработки спектров использовали программное обеспечение “OMNIC” компании “Thermo Scientific”. Для увеличения чувствительности использовали метод деконволюции пиков с аппроксимацией гауссовыми и лоренцевыми кривыми с помощью программного обеспечения ACD Labs 12.0.

3.2.4 Ультрафиолетовая спектроскопия

Ультрафиолетовую спектроскопию использовали для контроля процесса и изучения кинетики периодатного окисления. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре СПЕКС ССП - 715 в ультрафиолетовой области спектра 190-400 нм и в видимой области 400-900 нм. Результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения UV-Vis analyst.

3.2.5 Гель-проникающая хроматография

Молекулярно-массовое распределение исходных и полученных веществ анализировали методом гель-проникающей хроматографии на двух приборах. На жидкостном хроматографе Agilent 1200, снабженном двумя детекторами, соединенными последовательно: рефрактометрическим детектором и ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны. Анализ проводили на колонках Yedrogel 2000, 1000, 500 фирмы “Waters”, при температуре колонок – 25°C с водяным термостатированием. Элюент – 0,2М ацетатно-аммонийный буфер pH=8,4, скорость потока 0,5 мл/мин. В качестве стандартов для калибровки колонки использовали стандартные полиакриламиды и полиэтиленоксиды узкого молекулярно-массового распределения. Калибровочные кривые аппроксимировали полиномом 3^{ей} степени (рисунок 1):

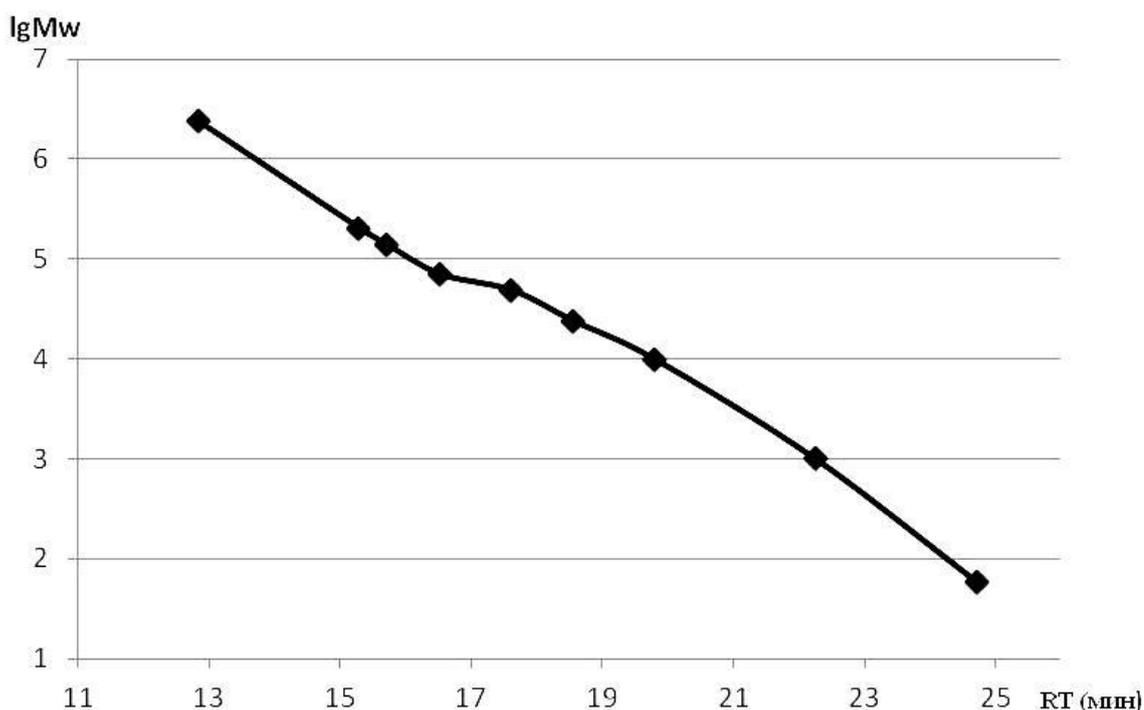


Рисунок 1 – Универсальная калибровочная кривая

Расчет полидисперсности и молекулярно массовых характеристик полимера: M_w ; M_n ; M_z ; M_{z+1} ; проводили с использованием универсальной калибровки и программного обеспечения “Millenium”.

А также на хроматографе Waters, снабженном спектрофотометрическим многоволновым детектором с диодной матрицей «Waters 2998PDA» и дифференциальным рефрактометрическим детектором «Waters 2414», соединенными последовательно.

Анализ проводили на двух последовательно соединенных колонках «Ultrahydrogel 1000» и «Ultrahydrogel 120», фирмы “Waters”, при температуре колонки 30°C с термостатированием. Элюент – водный боратный буферный раствор (рН = 10), скорость потока 0,3 мл/мин. Регистрацию УФ спектров проводили в интервале волн от 190 до 800 нм.

Для построения универсальной калибровочной зависимости использовали стандартные образцы полиэтиленгликоля с ММ от 20,6 кДа до 106 Да и стандартные образцы декстрана с ММ от 576 кДа до 7870 Да. Обработку полученных хроматограмм проводили с использованием программы «Breeze 2».

3.2.6 Атомно-силовая микроскопия

Для определения среднего размера пор и их распределения по размерам использовали микрофотографии, которые снимали на атомно-силовом микроскопе Solver NT-MDT в контактном (теппинговом) режиме измерения (Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН).

3.2.7 Обратное йодометрическое титрование

Степень окисления полученных диальдегидполисахаридов определяли методом обратного йодометрического титрования заместителей.

Методика титрования заместителя основана на прибавлении к анализируемому раствору избытка вспомогательного реагента, с которым определяемое вещество вступает в стехиометрическую реакцию. В результате образуется эквивалентное по отношению к анализируемому веществу количество нового соединения, которое называют заместителем. Заместитель оттитровывают прямым титрованием рабочим раствором тиосульфата натрия.

Четыре навески диальдегидполисахарида по 20 мг взвешенные с точностью до 0,1 мг растворяли в 10 мл 0,1 н NaOH каждую, перемешивали 5 минут, прибавляли по 20 мл 0,01 н раствора I₂ и перемешивали еще 30 минут, затем добавляли по 12 мл 0,1 н раствора HCl и оттитровывали 0,01 н раствором Na₂S₂O₃ до бледно-соломенного цвета. В каждую пробу добавляли по 2 мл раствора крахмала и титровали голубой раствор до обесцвечивания.

Степень окисления $\gamma_{ок}$ рассчитывали по формуле (1):

$$\gamma_{ок} = \frac{V(Na_2S_2O_3) \cdot N'(Na_2S_2O_3) \cdot 24.7 \cdot 10^3}{2g} \quad (1)$$

Где:

$$N' = \frac{V(I_2) \cdot N(Na_2S_2O_3)}{V'(Na_2S_2O_3)_{контр}} \quad (2)$$

$V'(Na_2S_2O_3)_{контр}$ – поправочный коэффициент, полученный путем титрования тиосульфата натрия йодом;

$$V(Na_2S_2O_3) = V(Na_2S_2O_3)_{хол.} - V(Na_2S_2O_3)_{контр}. \quad (3)$$

$V(Na_2S_2O_3)_{хол.}$ – объем, пошедший на титрование не окисленного полисахарида тиосульфатом натрия (холостой опыт);

$V(Na_2S_2O_3)_{контр}$ – объем, пошедший на титрование диальдегидполисахарида тиосульфатом натрия;

g – навеска полимера.

3.2.8 Исследование скорости биodeградации *in vitro*

Исследования проводили на основании ГОСТ 23041-78 по скорости выхода оксипролина из образца при его ферментативном гидролизе коллагеназой.

Метод построения градуировочного графика.

1. Приготовление цитрат-ацетатного буфера (pH=6,0).

50 г моногидрата лимонной кислоты, 23,6 г гидроксида натрия и 146,1 г тригидрата ацетата натрия помещали в мерную колбу, объемом 1 л и добавляли дистиллированную воду до метки.

Полученный раствор смешивали с 200 мл дистиллированной воды и 300 мл 1-пропанола. Раствор устойчив в течение нескольких недель.

2. Приготовление реактива хлорамина-Т.

Растворяли в 10 мл 1,41 г тригидрата N-хлор-п-толуолсульфамида натрия (хлорамина-Т) и последовательно добавляли 10 мл 1-пропанола и 80 мл буферного раствора. Раствор готовили непосредственно перед использованием.

3. Приготовление цветного реактива.

10,0 г перекристаллизованного п-диметиламинобензальдегида растворяли в 35 мл 60%-ного раствора хлорной кислоты, а затем медленно добавляли 65 мл изопропанола.

Этот раствор готовили в день использования.

4. Готовили основной раствор L-гидроксипролина, растворяя в воде 50 мг. Добавляли одну каплю раствора соляной кислоты и разбавляли водой до 100 мл. Данный раствор устойчив в течение 1 месяца при 4°C.

5. 5.00 мл основного раствора разбавляли до 500 мл водой в мерной колбе. Затем готовили шесть стандартных раствора, разбавляя водой 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мл этого раствора до 100 мл и получали соответственно концентрации L-гидроксипролина 0,5; 1; 1,5, 2, 2,5 и 3 мкг/мл.

6. 4.00 мл раствора каждой концентрации (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 и 3 мкг/мл) переносили в пробирки и добавляли в каждую по 2 мл реактива хлорамина-Т, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на (20±1) мин.

7. Добавляли по 2.00 мл цветного реактива в пробирки, тщательно перемешивают (до потери белой окраски) и закрывали алюминиевой фольгой.

8. Пробирки быстро переносили на водяную баню, температура которой (60±5)°C и нагревали в течение точно 20 мин.

9. Охлаждали пробирки под струей воды не менее 3 минут.

10. Измеряли оптическую плотность при длине волны 558 нм не позднее, чем через 30 минут.

11. Вычитали оптическую плотность контрольного раствора и строили градуировочный график.

Биодеградация коллагена:

12. Приготовление трис-буфера.

2,43 г трисгидроксиметиламинометана растворяли в 100 мл воды. Сливали 25 мл раствора триса и 40 мл раствора 0,1 М HCl в мерную колбу на 100 мл. Затем добавляли 0,111 г хлорида кальция CaCl₂ и 2,34 г хлорида натрия и доводили дистиллированной воды до метки.

13. Подготовка навески к испытанию.

Помещали навеску образца, содержащего 0,1 г коллагена, в колбу. Добавляли 22,5 мл трис - буфера (pH 7,4) и оставляли на ночь. Затем к смеси добавляли 518 CDU (2,5 мг) коллагеназы, и термостатировали при 37 °С в течение необходимого времени при постоянном перемешивании.

14. Через необходимое время отбирали аликвотную часть гидролизата 4 мл (концентрация оксипролина должна быть от 0,5 до 3 мкг/мл), добавляли две капли ЭДТА концентрации 0,5 масс.% перемешивали, затем смесь фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм.

15. 4 мл полученного раствора переносили в пробирку и добавляли 2 мл реактива хлорамина-Т, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на (20±1) мин.

16. Добавляли 2 мл цветного реактива, тщательно перемешивали и закрывали пробирку алюминиевой фольгой. Пробирку быстро переносили в водяную баню с температурой 60°С и нагревали в течение 20 мин. Охлаждали под струей воды в течение не менее 3 мин.

17. Оптическую плотность измеряли при длине волны 558 нм в кювете длиной 1 см на спектрофотометре СПЕКС ССП - 715 не позднее чем через 30 минут.

18. Вычитали оптическую плотность контрольного раствора и находили концентрацию оксипролина по калибровочному графику.

19. Приготовление контрольного раствора.

Отбирали 4 мл раствора трис-буферного раствора (pH=7,4), добавляли две капли 0,5 % раствора ЭДТА, переносили в пробирку и добавляли 2 мл реактива хлорамина-Т, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на (20±1) мин.

Добавляли 2 мл цветного реактива, тщательно перемешивали и закрывали пробирку алюминиевой фольгой. Пробирку быстро переносили в водяную баню с температурой 60 °С и нагревали в течение 20 мин. Охлаждали под струей воды не менее 3 мин. Определяли оптическую плотность.

20. Выражение результатов

Для каждой навески массовую долю оксипролина в процентах к массе продукта вычисляли по формуле (2):

$$w = \frac{C \cdot V_1^k \cdot V_2^k \cdot 10^{-6}}{m \cdot V_{pip}} \cdot 100\% \quad (2)$$

Где

C - концентрация оксипролина, найденная по градуировочному графику;

V_1^k -первоначальный объем, в котором растворяли образец;

V_2^k -объем колбы, в котором растворяли пробиодеструктивированный образец;

V_{pip} -объем аликвоты, отобранной для разбавления до объема V_2^k .

m – масса навески, г.

3.2.9 Исследования биodeградации *in vivo*

Биodeградацию изучали способом подкожной имплантации крысам образцов в виде стандартных таблеток весом 210 мг диаметром 7,5 мм и толщиной 2,5 мм. Образцы имплантировали подкожно половозрелым крысам-самцам линии Wistar сроком на 60 дней. Исследуемые образцы извлекали и

оценивали биосовместимые свойства материала по образованию тканевой капсулы, степени воспаления и нагноения в ране, а так же оценивали степень биодеградации по изменению размера образца (рисунок 2). Исследования проводили в ЦИТО им. Н.Н. Приорова.

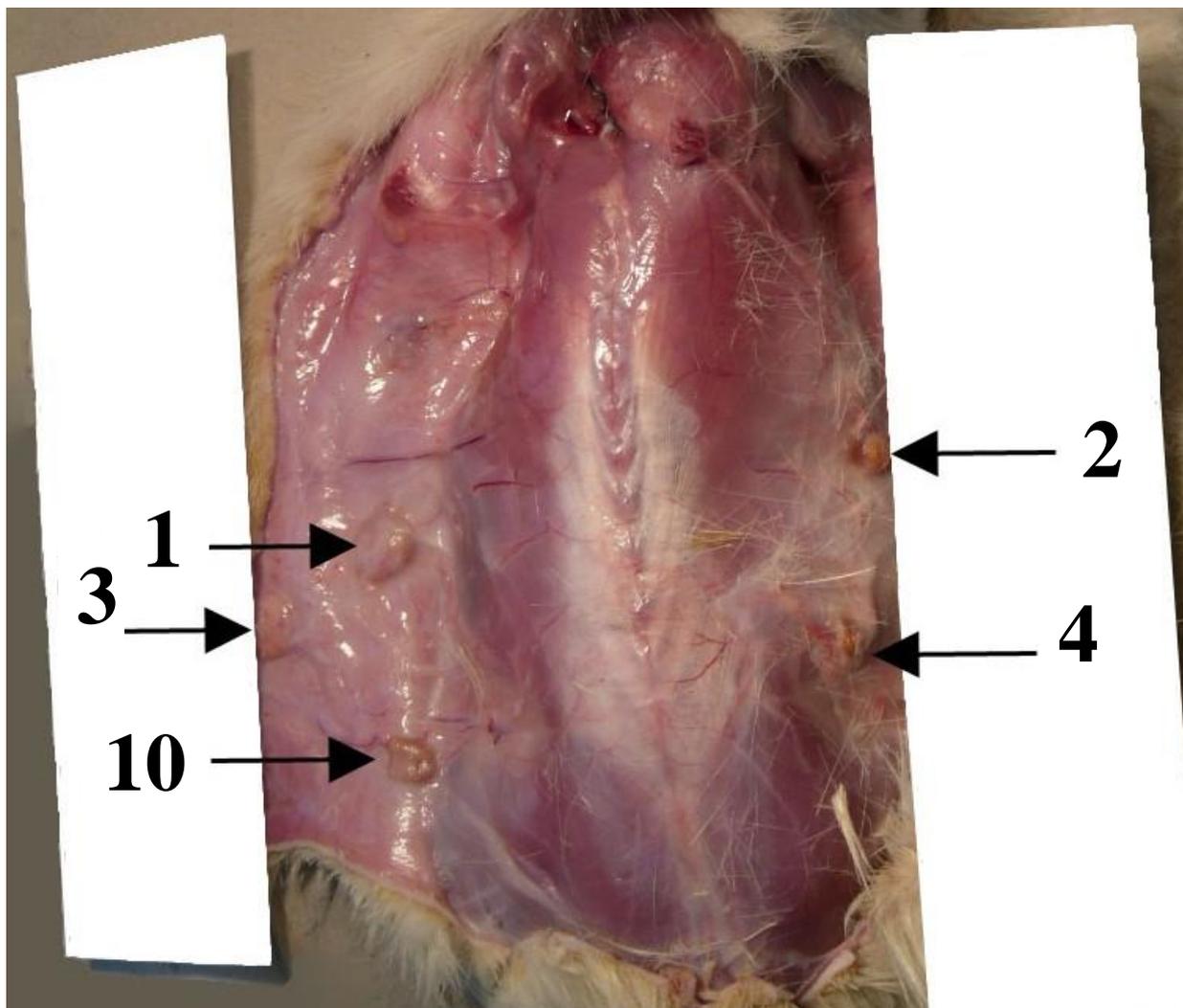


Рисунок 2 – Подкожная имплантация. 1, 2, 3, 4, 10 – номера исследуемых образцов

3.2.10 Исследование полисахаридных композиций для замещения костной ткани на экспериментальной модели сегментарной резекции большеберцовой кости крысы методом *in vivo*

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах линии Wistar весом 150-200 грамм под тиопенталовым наркозом (внутрибрюшинно из расчета 6 мг на 100 г веса) в стерильных условиях. В ходе операции после

обработки операционного поля раствором йода производили разрез кожи по проекции большеберцовой кости (рисунок 3).



Рисунок 3 – Разрез кости по проекции большеберцовой кости

После обнажения средней трети большеберцовой кости с помощью электрической пилы производили сегментальную резекцию в средней трети диафиза на протяжении 0,5 см (рисунок 4).



Рисунок 4 – Создание дефекта критического размера

Исследуемый композиционный материал помещали в дефект, полностью восполняя его. Фиксирование дистального, проксимального концов кости и

имплантируемого материала производилось интрамодулярно карбоновой спицей (рисунок 5).

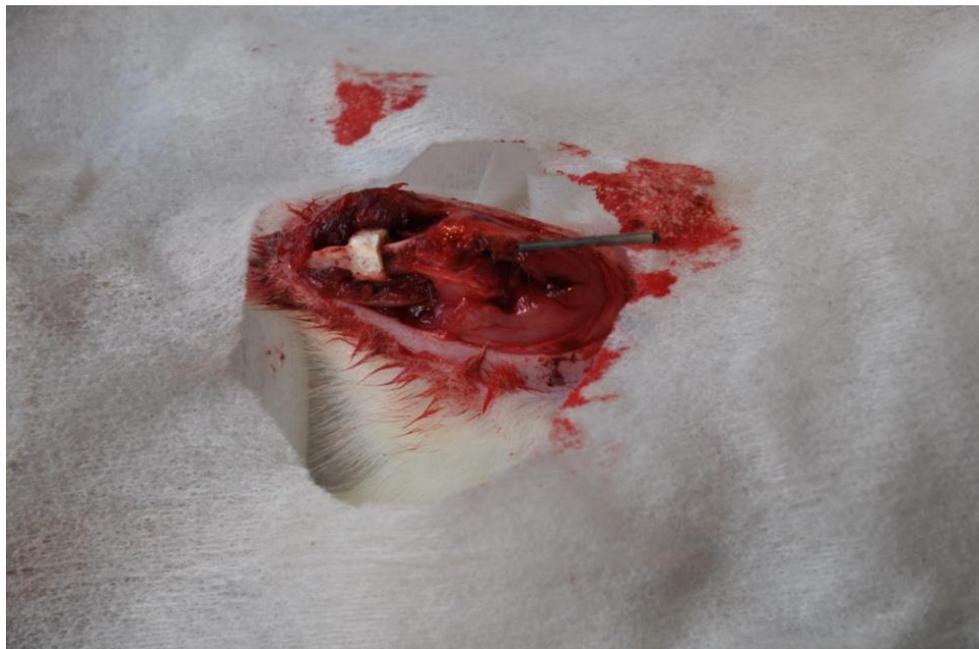


Рисунок 5 – Восполнение дефекта и фиксация карбоновой спицей

Отдельными кетгутовыми швами из местных тканей (мышцы, сухожилия и фасции средней трети предплечья) создавали футляр, удерживающий имплантат в области костного дефекта. Операция заканчивалась послойным ушиванием раны отдельными кетгутовыми швами наглухо (рисунок 6).



Рисунок 6 – Окончание операции

«Контрольное наблюдение» имплантация ДКМ.

Остеосинтез большеберцовой кости левой задней лапы экспериментального животного, положении «на спине». В костный диастаз имплантировали ксеногенный ДКМ обработанный 1% солянокислым гуанидином.

«Опытное наблюдение» полисахаридных композиций.

Остеосинтез большеберцовой кости правой задней лапы экспериментального животного, в положении «на спине». В костном диастазе фиксировали полисахаридный композиционный материал.

Срок имплантации исследуемых материалов составил 30 суток и 60 суток.

Оценку остеоиндуктивности остеопластического полисахаридного материала производили путем оценки выраженности регенераторного процесса в области костной резекции с помощью рентген-томографической денситометрии, томографического и гистологического исследований на 30 и 60 сутки после оперативного вмешательства.

Животных выводили из эксперимента, согласно приказу МЗ СССР №755 от 12 августа 1977 года, передозировкой тиопентала.

Рентгено-томографическая денситометрия.

Сравнительную оценку плотности вновь образованного костно-хрящевого регенерата производили с помощью рентген-томографической денситометрии, на микротомографе «SkyScan 1176» с построением графика распределения плотности по шкале Хаусфильда для опытного и контрольного образцов аутопсийного материала.

Томографическое исследование.

Томографическое исследование аутопсийного материала полученного в различные сроки после имплантации проводили с помощью микротомографа

«SkyScan 1176» с последующим построением 3D моделей с использованием компьютерной программы «Avisio 7».

Гистологическое исследование.

Аутопсийный материал, полученный в различные сроки наблюдения, фиксировали в 10% формалине на фосфатном буфере рН 7,2-7,4. Декальцинацию проводили в 7% азотной кислоте. Полученный декальцинированный материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали парафином. Из полученных парафиновых блоков изготавливались срезы толщиной 7-8 мкм, с последующей окраской гематоксилином и эозином. Полученные гистологические препараты исследовали на световом микроскопе Nikon E200.

3.2.11 Клеточная модель остеоиндукции – способности вызывать рост клеток и их дифференциацию по остеогенному пути

Исследование биологической активности полисахаридного костнозамещающего материала было проведено с использованием первичной культуры клеток пульпы зуба (Th1) выделенных из зачатка третьего моляра, извлеченного по ортодонтическим показаниям у здорового пациента 16 лет. Клетки извлекли из пульпы зуба промывкой струей среды ДМЕМ/F12, содержащей 200Ед/мл пенициллина и 200мкг/мл стрептомицина через иглу шприца, вставленную в верхушку канала зуба. Выделенные клетки собрали центрифугированием в течение 2 минут при 1500 об/мин, подвергли обработке раствором 0,25% трипсин-0,02%ЭДТА в течение 30 минут при 37оС, собрали центрифугированием и культивировали в среде ДМЕМ/F12 (1:1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) и 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина в атмосфере 5% CO₂.

Клетки переводили в суспензию, используя раствор 0,25% трипсин-0,02%ЭДТА и высевали в лунки 96-луночного культурального планшета

(NUNC) в количестве 50 тыс/см². Через 18 часов и на 4 сутки после посева клеток проводили полную замену среды в лунках на среду, содержащую 100мкг/мл суспензии полиакрилимидного композиционного костнозамещающего материала. Дифференцировочную активность клеток оценивали через 7 суток культивирования путем окраски соединений кальция ализариновым красным и определения активности в клетках щелочной фосфатазы.

3.2.12 Определение степени кальцификации клеточной культуры. Оценка способности вызывать дифференциацию клеток по остеогенному пути (превращаться в клетки выращивающие кость)

Определение степени кальцификации проводили путем окрашивания отложений фосфорнокислого кальция красителем Alizarin Red (pH = 4.1). Для этого после окончания культивирования клетки были промыты 0,01 М фосфатным буфером (pH=7,4) и зафиксированы в течение 20 минут в 3,7% забуференном растворе формальдегида. После удаления фиксатора и промывки деионизованной водой клетки были окрашены 2% раствором ализаринового красного в течение 5 минут для выявления образования минерализованного матрикса. Степень окрашивания соединений кальция определяли путем измерения оптической плотности при длине волны 490 нм с помощью фотометра (модель 680 BIO-RAD, США). В качестве контроля фона были использованы пустые (без клеток) лунки 96 луночного планшета, обработанные по общей методике. Оценку морфологии клеток и количества кальцификатов проводили на микроскопе Axiovert 200 (Карл Цейс, Германия).

3.3.13 Определение активности щелочной фосфатазы в клеточной культуре. Оценка способности вызывать рост и деление клеток

Определение активности щелочной фосфатазы проводили с использованием набора реагентов (Alkaline phosphatase kit, Sigma 86-R)

согласно инструкции производителя. Степень окрашивания клеток определяли путем измерения оптической плотности при длине волны 490 нм с помощью фотометра (модель 680 BIO-RAD, США). Оценку морфологии и окрашивания клеток проводили на микроскопе Axiovert 200 (Карл Цейс, Германия)

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Origin 8.1, за ошибку принимали среднеквадратичное отклонение от среднего значения, за достоверные принимали различия по U-критерию Манна – Уитни при $p < 0,05$.

3.3 Методики получения полупродуктов и конечных веществ

3.3.1 Синтез диальдегиддекстрана

Навеску 1,9020 г NaIO_4 растворяли в 10 мл воды. К 200 мл «Полиглюкина», содержащего 12 г декстрана, приливали раствор NaIO_4 . Раствор оставляли в темноте в колбе с открытым горлом при перемешивании на 24 часа. Реакционную смесь диализовали против дистиллированной воды. Мешок для диализа изготовлен из диализной мембраны с пределом пропускания по белку 1600 Да. Диализовали в ячейке объемом 5 литров при перемешивании, против дистиллированной воды в течение 3 суток с пятикратной сменой воды. По окончании диализа реакцию на IO_3^- ион контролировали по йодкрахмальной бумаге. При положительной реакции диализ продолжали дополнительно в течение 3 суток. Диализат упаривали на роторном испарителе под вакуумом до сиропообразного состояния при температуре бани не более 45°C либо концентрировали тангенциальным диализом. Продукт лиофилизировали без нагрева с использованием лиофильной сушилки Leybold Heraeus.

3.3.2 Синтез диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы

К раствору, содержащему 2 г натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) в 200 мл дистиллированной воды, добавляли раствор расчетного

количества NaIO_4 в 20 мл воды. Смесь оставляли в темноте в колбе с открытым горлом при перемешивании на 96 ч при комнатной температуре. По окончании реакции смесь диализовали против дистиллированной воды 24 часа с трехкратной сменой диализной воды до отрицательной реакции диализата на ион IO_3^- по йодкрахмальной бумаге, затем производили дополнительную четвертую смену диализной воды. Через 24 часа дополнительного диализа раствор лиофилизовали с использованием лиофильной сушилки Leybold Heraeus.

3.3.3 Восстановление диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы

К навеске 0,2 г диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы (степень окисления $\gamma = 80,4$), растворенной в 10 мл дистиллированной воды, приливали водный раствор боргидрида натрия содержащий 5 кратный мольный избыток боргидрида в расчете на мольное содержание окисленных звеньев в полимере. Реакционную смесь титровали 0,1 н раствором HCl до $\text{pH}=8$ по универсальной индикаторной бумаге. Полученный раствор диализовали против дистиллированной воды в течение 3 часов с трехкратной сменой диализной воды. Диализат лиофилизовали.

3.3.4 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе натриевой соли диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы и коллагена

1 г диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы растворяли в 20 мл 0,01 М раствора NaOH . 100 мл раствора коллагена фирмы «СИНАП» диализовали 4 часа против дистиллированной воды. Затем растворы диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы и коллагена смешивали в массовом соотношении ДАКМЦ:коллаген равном 1:1, 5:1 и 1:5. К каждому из полученных растворов добавляли по 5 мл 0,2 М боратного буфера $\text{pH}=8,7$. Полученные растворы перемешивали на магнитной мешалке 24 часа при комнатной температуре. Продукты лиофилизовали.

3.3.5 Синтез фосфазен-белкового конъюгата на основе гекса-[п-формилфенокси]циклотрифосфазена и коллагена «СИНАП»

50 мг гекса-[п-формилфенокси]циклотрифосфазена растворяли в 10 мл ДМСО. После полного растворения прикапывали 100 мл предварительно диализованного в течение 2-х часов раствора коллагена фирмы «СИНАП». Реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов, после чего диализовали и лиофилизовали.

3.3.6 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе диальдегиддекстрана и коллагена «СИНАП»

0,2 г коллагена «СИНАП» растворяли в 20 мл боратного буфера (рН=8,7). 2,6315 г диальдегиддекстрана растворяли в 50 мл H₂O. Затем растворы смешивали в различных объемных соотношениях (1:1; 1:5; 5:1) для получения конъюгатов (таблица 10).

Таблица 10 – Состав конъюгата

Объемное соотношение ДАД : коллаген	Массовое соотношение ДАД : коллаген	Загрузка
1:1	5,22:1	6,67 мл раствора коллагена+ 6,67 мл раствора ДАД
5:1	26,16:1	6,67 мл раствора коллагена+ 33,33 мл раствора ДАД
1:5	1,044:1	6,67 мл раствора коллагена+ 1,33 мл раствора ДАД

Полученные растворы перемешивали 24 часа при комнатной температуре. Продукты лиофилизировали.

3.3.7 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе диальдегиддекстрана и коллагена «СИНАП»

1,3158 г диальдегиддекстрана растворяли в 25 мл дистиллированной воды. 73 мл коллагена фирмы «СИНАП» диализовали 4 часа против дистиллированной воды. К 73 мл диализованного коллагена прилили 40 мл боратного буфера с $\text{pH}=8,7$ и водный раствор диальдегиддекстрана. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов, после чего диализовали, а потом лиофилизировали. Полученный гликопротеин имеет массовое соотношение носитель:коллаген = 3,28:1.

3.3.8 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе низкоокисленного диальдегиддекстрана и инсулина

Готовили 2,5% раствор инсулина. Для этого растворили 25 мг инсулина в 1 мл дистиллированной воды. Затем приготовили 5%-ный раствор полимера-носителя диальдегиддекстрана ($\gamma_{\text{ок}} = 14,1\%$). Для этого растворяли 250 мг ДАД в 4,8 мл дистиллированной воды. После полного растворения инсулина и диальдегиддекстрана сливали растворы, добавили 5 мл боратного буфера ($\text{pH}=8,7$) и перемешивали в течение 24 часов на магнитной мешалке при комнатной температуре. По окончании перемешивания раствор лиофилизировали. В продукте соотношение полисахарид:белок = 10:1.

3.3.9 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе высокоокисленного диальдегиддекстрана и инсулина

Растворяли 200 мг диальдегиддекстрана ($\gamma_{\text{ок}} = 96,0\%$) в 4 мл боратного буфера ($\text{pH}=8,6$). Растворяли 50 мг инсулина в 1 мл дистиллированной воды. После полного растворения веществ раствор инсулина медленно добавляли к раствору диальдегиддекстрана при перемешивании на магнитной мешалке. Реакцию вели в течение 24 часов при комнатной температуре. По окончании перемешивания продукт диализовали в течение 5-6 часов против

дистиллированной воды с двухкратной сменой диализного раствора. Диализованный продукт выделяли из раствора лиофилизацией.

3.3.10 Синтез белково-полисахаридного конъюгата (гликопротеина) на основе натриевой соли диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы и инсулина

Навеску 0,05 г карбоксиметилцеллюлозы растворяли в 5 мл 0,01М раствора NaOH. Навеску 0,02 г инсулина растворяли в 5 мл дистиллированной воды. Смешивали полученные растворы и к смеси добавляли 5 мл боратного буфера (рН=8,7), реакционную смесь перемешивали 24 ч на магнитной мешалке при комнатной температуре, раствор диализовали против дистиллированной воды, продукт выделяли лиофилизацией.

3.3.11 Изготовление таблеток для подкожной имплантации

Композиции для подкожной имплантации готовили смешением 100 мг гликопротеина приготовленного из диальдегиддекстрана ($\gamma_{ок}=14,1\%$), гидроксиапатита (ГА) и коллагена с 10 мг амикацина. Соотношение полисахарида и белка в гликопротеине задавали на стадии его приготовления. Таблетки диаметром 7,5 мм и высотой 2,5 мм прессовали на гидравлическом прессе Carver под давлением 0,1 т (таблица 11). Полученные заготовки испытывали без пропитки или пропитывали цианакрилатным полимерным связующим.

Для типа смешения «Ж» таблетку изготавливали по следующей методике:

Смешали 100 мг данного конъюгата с 3 мл дистиллированной воды. Затем добавляли 100 мг ГА и тщательно перемешивали. Затем добавляли 10 мг амикацина и также тщательно перемешивали. После тщательной гомогенизации смеси ее лиофилизовали. После лиофилизации отбирали 200 мг

высушенного вещества и отпрессовывали таблетку, которую обрабатывали раствором этилцианакрилата в ацетоне.

Для типа смешения «Т» таблетки изготавливали по следующей методике:

Смешивали 100 мг выбранного конъюгата со 100 мг гидроксиапатита в агатовой ступке, тщательно перемешивали. Затем добавляли 10 мг амикацина и также тщательно перемешивали. После гомогенизации смеси отпрессовывали таблетку. Таблетку обрабатывали раствором этилцианакрилата либо использовали без связующего.

Таблица 11 – Состав образцов для подкожной имплантации с ДАД

№	Полимерный носитель	Соотношение носитель: коллаген	Кол-во ГА	Тип смешения
1	ДАД	3,28:1	100	Ж
2		3,28:1	100	
3		3,28:1	190	
4		26,16:1	100	
5		5,22:1	100	
6		5,22:1	190	
7		1,044:1	190	
8	-	-	100	Т
9	ГФЦФ	1:10	190	
10	ДАД	26,16:1	100	
11	ДАД	26,16:1	-	
12	ГФЦФ	1:9	-	
13	ДАКМЦ	12,3:1	-	

Композиции с ДАКМЦ для подкожной имплантации готовили смешением 200 мг гликопротеина приготовленного из диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы и коллагена с 10 мг амикацина. Соотношение полисахарида и белка в гликопротеине задавали на стадии его

приготовления. Таблетки диаметром 7,5 мм прессовали на гидравлическом прессе Carver под давлением 0,1 т. Полученные заготовки использовали без связующего либо пропитывали цианакрилатным связующим.

3.3.12 Изготовление композиций для испытания

остеокондуктивности

Образцы готовили смешением всех указанных компонентов (таблица 12) с последующей лиофилизацией и обработкой фторированным эфиром цианакриловой кислоты.

Таблица 12 – Состав образцов для имплантации в диастаз с ДАД

№ образца	1	2	3	4	7	8	9	10
5 % раствор ДАД*, мл	0,5	1,0	1,5	2,0	-	-		
10% раствор ДАД*, мл	-	-	2,0	-	-	2,5		
5% раствора ДАКМЦ, мл							2	
5% раствора ДАКМЦ, мл								1,0
C ₂ H ₅ OH, мл	0,5	-	-	-	-	-		
H ₂ O, мл	0,5	-	-	-	-	-		
ДМСО, мл	-	-	-	-	0,5	-		
Коллаген фирмы «СИНАП», мл	5,5	6,0	5,5	5,0	7,5	5,5	6	7
Раствор ДАД:инсулин= =10:1, 1,96%, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-		
5 % раствор инсулина							1,0	1,0

Продолжение таблицы 12

№ образца	1	2	3	4	7	8	9	10
Амикацин, мг	10,0	10,0	10,0	10,0	-	10,0	10,0	10,0
ГФЦФ, мг	30,0	-	-	-	-	-		
ГКЦФ, мг	-	-	-	-	30,0	-		
Хондроитин сульфат, мг	-	55,0	-	-	-	-		

3.3.13 Изготовление таблетки для определения пористости образца при помощи атомно-силовой микроскопии

Для изготовления таблетки брали фосфазен-белковый конъюгат на основе гекса-[п-формилфенокси]циклотрифосфазена и коллагена $m=0,0541$ г, из которого на ручном прессе спрессовывали таблетку $d=7,5$ мм, $h=2,5$.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГЗ – ангидроглюкозное звено

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГА – гидроксиапатит

ГЖ – горючие жидкости

ГКЦФ – гекса-[п-карбоксилфенокси]циклотрифосфазен

ГПХ – гель-проникающая хроматография

ГФЦФ - гекса-[п-формилфенокси]циклотрифосфазен

ДАД – диальдегиддекстран

ДАКМЦ – диальдегидкарбоксиметилцеллюлоза

ДКМ – деминерализованный костный матрикс

ДМСО – диметилсульфоксид

ИК – инфракрасный

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

ЛВЖ – легковоспламеняющиеся жидкости

ММР – молекулярно-массовое распределение

НГА – наногидроксиапатит

ПДК – предельно допустимая концентрация

ТГФ – тетрагидрофуран

УФ – ультрафиолетовая спектроскопия

ФАВ – физиологически активное вещество

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса

ВМР – Bone Morphogenetic Protein (костный морфогенетический белок)

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sandra Klein. Polysaccharides in Oral Drug Delivery – Recent Applications and Future Perspectives // Polysaccharide Materials: Performance by Design; Edgar K., et al.: ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington DC. 2010.
2. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3 т. Т. 1. Пер с англ. // М.: Мир, 1985. С. 367. ил.
3. Дженкинс М. Полимеры в биологии и медицине // М: Научный мир. 2011.
4. Мусатов П.П., Михайлов Д.А., Рогинский В.А. Сб. // Материалов конф. "Биоантиоксидант". Москва, 1993. ч. I. С. 210.
5. Розенфельд Е.Л. Декстран, его особенности и значение как заменителя плазмы крови // Усп. Биол. Химии. 1958. № 3. С. 366-387.
6. Федоров Н.А., Козинер В.Б. Механизм действия полиглюкина. М.: Медицина. 1974.
7. Metzmacher I. Enzymatic Degradation and Drug Release Behavior of Dense Collagen Implants // München. 2005. P. 230.
8. Декстраны и декстраназы // Успехи биологической химии, т. 16, М., 1975. С. 214-35.
9. Dextran bibliography, ed. by A. Jeanes, Wash. 1978.
10. Walker G.J., "Internet Rev. of Biochem" // Biochemistry of Carbohydrate, v. 16, Balt. 1978. P. 75-126.
11. Николаев А.Ф., Охрименко Г.И. Водорастворимые полимеры. Л.: Химия. 1979. С. 144.

12. Вирник А.Д., Хомяков К.П., Скокова И.Ф. Декстран и его производные // Успехи химии. Т. XLIV. 1975 г. Выпуск 7
13. Плате Н.А., Васильев А.Е. Физиологически активные полимеры. М.: Химия. 1986. С. 296.
14. Бочков А.Ф., Афанасьев В.А., Заиков Г.Е. Углеводы. М.: Наука. 1980. С.176.
15. Б.Д. Лаврухин, И.И. Кандрор, Т.И. Гусева, Н.Г. Сенченя, И.В. Лопатина, К.А. Магер, Ю.Г. Гололобов. // Высокомолекул. соединения. Т. 32Б. С. 55. 1990.
16. Гибиетис Я.Л., Зицманис А.Х., Спинце Б.А. // Способ получения диальдегиддекстрана. - Авт. свид. N 1530630.
17. Хомяков К. П., Вирник А.Д., Ушаков С.Н., Роговин З.А. // Синтез полимерных лекарственных соединений на основе производных декстрана. Высокомолек. соед. 1965. Т.7, N 6. С. 1035-1040
18. Хомяков К.П., Пененжик М.А., Вирник А.Д., Роговин З.А. // Синтез диальдегид- и дикарбоксилдекстрана. - Высокомолек. соед. 1965. Т.7. № 6. С.1030-1034.
19. Гумникова В. И. , Дятлов В. А. , Гребенева Т. 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.
20. Лившиц В.С., Заиков Г.Е. Лекарственные формы на основе биодеструктурирующихся полимеров // Хим. фарм. ж. 1991. № 1. С.15-25.
21. Molteni L. Dextran and Inulin Conjugates as Drug Carriers // Meth. Enzymol. 1985. V.112. Pt. A. P. 285-297.
22. Роговин З. А. Химия целлюлозы, М. 1972. С. 520.

23. 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.
24. Смит В., Вочков А., Кейпл Р. Органический синтез. Наука и искусство. 2001. С. 263, 292.
25. 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.
26. Н.К. Матвеева, Ю.М. Львов, К.А. Магер, И.В. Лопатина, Н.Г. Сенченя, Т.И. Гусева, Ю.Г. Гололобов. // Высокомол. соединения. С. 444. 1995.
27. Азаров В.И. Химия древесины и синтетических полимеров, 1999. С. 629.
28. Манушин В.И. Целлюлоза, сложные эфиры целлюлозы и пластические массы на их основе. 2002. С. 107.
29. Феттес Е.Н. Химические реакции полимеров том 2. 1967. С. 536.
30. Сюткин В.Н., Николаев А.Г., Сажин С.А., Попов В.М., Заморянский А.А. Азотсодержащие производные диальдегидцеллюлозы. 1. Диальдегидцеллюлоза высокой степени окисления // Химия растительного сырья. 1999. №2. С. 91–102.
31. Коршак В.В., Штильман М.И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений // М., издательство «Наука». 1984. С. 261.

32. Sara I.F.S. Martins*, Wim M.F. Jongen and Martinus A.J.S. van Boekel. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling // Trends in Food Science & Technology. 11. 2001. 364–373.
33. Food Chemistry by Belitz, Grosch, and Schieberle. 4th edition. Springer. 2009.
34. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body // Ledl and Schleicher Angewandte Chemie 1990. 29. 6. 565-594.
35. Племенков В.В. Введение в химию природных соединений. Казань. 2001. С. 376.
36. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И., Миронов П.В. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии // Красноярск: ИПК СФУ. 2009. С. 262.
37. Волова Т.Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии: электрон. учеб. пособие // Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая, П.В. Миронов. Электрон. дан. Красноярск: ИПК СФУ. 2009.
38. Макарова Э.Б., Рубштейн А.П., Близнец Д.Г. Пористые титановые имплантаты с алмазоподобным покрытием для замещения костной ткани // International journal of experimental education. 2011. №3. С. 142-143.
39. Миронов С.П., Гинцбург А.Л., Еськин Н.А., Лунин В.Г., Гаврюшенко Н.С., Карягина А.С., В.В. Зайцев. Экспериментальная оценка остеоиндуктивности рекомбинантного костного морфогенетического белка (rhBMP-2) отечественного производства, фиксированного на биокомпозиционном материале или костном матриксе // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2010. №4. С.38-43.
40. Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения // Высокомолекулярные соединения. 2010. Т. 52. №9. С. 884-899.
41. W. Friess. Collagen – biomaterial for drug delivery // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 1998. №45. P. 113-136.

42. Вознесенский Э. Ф., Абдуллин И. Ш., Красина И. В. Построение обобщенной плоскостной геометрической модели коллагена кожи // Вестник Казанского технологического университета. 2010. №9. С. 530-534.
43. N. Grassie, G. Scott. Polymer degradation and stabilation // University press. Cambridge. P. 45. 1985.
44. Boot-Handford R.P., Tuckwell D.S. Fibrillar collagen: the key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest.// Bioessays. 2003 Feb. 25(2).142-51.
45. Franzke C.W., Bruckner P., Bruckner-Tuderman L. Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology // J. Biol. Chem. 2005. Feb. 11. 280(6). 4005-8.
46. Metzmacher I. Enzymatic Degradation and Drug Release Behavior of Dense Collagen Implants. München. 2005. P. 230.
47. Страйер Л., Биохимия: Пер. с англ. // М. Мир, 1984. Т.1. С. 232. Ил.
48. Северин Е.С. Биохимия. М.: ГЭОТАР-МЕД. 2004. 768 С.
49. Lazarus G.A., Daniels J.R., Brown R.S., Bladen H.A., Fullmer H.M. Degradation of collagen by a human granulocyte collagenolytic system // The Journal of Clinical Investigation. 1968. Vol. 47. P. 2622 – 2629.
50. Нечаева Ю.В., Маклакова И.А. Биоматериалы для костной пластики//Биоматериалы. 2004. № 2. С. 2-4.
51. Данильченко С.М. Структура и свойства апатитов кальция с точки зрения биоминералогии и биоматериаловедения (обзор) // Вісник Сум ДУ. 2007. №2. С. 33-59.
52. Кесяном Г.А., Берченко Г.М., Уразгильдеев Р.З., Арсеньев И.Г. Использование Коллапана в комплексном лечении оскольчатых переломов длинных трубчатых костей // Биоматериалы. 2004. №2. С. 5-7.

53. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии. Т.3. Пер. с англ. Перевод Гиномана Л.М. под ред. Овчинникова Ю.А.. М. Мир. 1981. С. 726. Ил.
54. Валуев Л.И. Полимерные системы для контролируемого выделения инсулина // Высокомолек. Соед. 1995. Т.37. № 11. С. 1960-1968.
55. Лившиц В.С., Курганов Б.И. Принципы создания полимерных систем с саморегулируемым высвобождением лекарственных средств // Хим.-фарм.ж. 1990. № 2. С. 150.
56. Оллок Г. Р. Фосфоразотистые соединения // М. Мир. 1976. С. 563.
57. Gleria M., Jaeger R. De, Polyphosphazenes: A Review // Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 2005.
58. Andrianov A. K. Polyphosphazenes for biomedical applications // John A. Wiley&Sons, INC. Publication. 2009. P. 547 p.
59. R.A. Nelson, D.C. Kram, J.E. Robertson. // Arch. Surg. V. 100. P. 295. 1970.
60. И. Хироо. // Хэмен. Т. 29. С. 892. 1991.
61. R. Chuanliang, L. Jinhui, Q. Zhaoyin. // Polym. Mer. Sci. Eng. V. 56. P. 216. 1987.
62. J.G. Magan, M.P. Hogan, W. Plan, J.G. Lunney // Chemtronics. V. 4. P. 74. 1980.
63. Патент № 6311166 Япония. 1989.
64. C. Chauvierre, M.C. Marden, C. Vauthier, D. Labarre, P. Couvreur, L. Leclerc // Biomaterials. V. 25. P. 3081. 2004.
65. И. Хироо. // Хэмен. Т. 29. С. 892. 1991.
66. Koukoubis T.D., Gilsson R.R., Feagin Jr. J.A., Seaber A.V., Vail TP.

67. Augmentation of meniscal repairs with cyanoacrylate glue // J. Biomed. Mater. Res. 1995. Vol. 29. P. 715–720.
68. Leonard F., Kulkarni R.K., Brandes G., Nelson J., Cameron J.J. Synthesis and degradation of poly(alkyl α -cyanoacrylates) // J. Appl. Polym. Sci. 1966. Vol. 10. P. 259–272.
69. Vauthier C., Dubernet C., Fattal E., Pinto-Alphandary H., Couvreur P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications // Adv. Drug Deliv. Rev. 2003. Vol. 55. P. 519–548.
70. Lenaerts V., Couvreur P., Christiaens-Leyh D., Joiris E., Roland M., Rollman B. Degradation of poly(isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles // Biomaterials. 1984. Vol. 5. №65. P. 8.
71. М.С. Шапиро. Цианакрилатные клеи в травматологии и ортопедии. // Медицина. Москва. 1976.
72. Sullivan C.O., Birkinshaw C. In vitro degradation of insulin-loaded poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles // Biomaterials. 2004. Vol. 25. P. 4375–4382.
73. Scherer D., Robinson J.R., Kreuter J. Influence of enzymes on the stability of polybutylcyanoacrylate nanoparticles // Int. J. Pharm. 1994. Vol. 101. P. 165–168.
74. Williams J.M., Adewunmi A., Schek R.M., Flanagan C.L., Krebsbach P.H., Feinberg S.E., Hollister S.J. and Das S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering // Biomaterials. 2005. №26. P. 4817–4827.
75. Дженкинс М. Полимеры в биологии и медицине. Пер. с англ. О.И. Киселева // М.: Научный мир. 2011. 256 с.
76. Correlo V.M., Boesel L.F., Pinto A.R., Bhattacharya M., Reis R.L., Neves N.M. Novel 3-D chitosan/polyester scaffolds for bone and cartilage tissue engineering

- // Proceedings of the 19th European Conference on Biomaterials (ESB 2005), Sorrento, Italy, 2005. Naples, EffeErreCongressi. 2005. P. 323.
77. Pinto A.R., Salgado A.J., Oliveira T.J., Correló V.M., Bhattacharya M., Charbord P., Reis R.L., Neves N.M. Preliminary assessment of the potential of chitosan/polyester based scaffolds for bone and cartilage tissue engineering // Proceedings of the 30th Annual Meeting and Exposition: New Applications and Technologies (SFB 2005). Memphis, Tennessee, USA. 2005. Mt Laurel, New Jersey. Society for Biomaterials. 2005. P.154.
78. Pinto A.R., Salgado A.J., Oliveira T.J., Correló V.M., Bhattacharya M., Charbord P., Reis R.L., Neves N.M. Evaluation of the adhesion, proliferation and differentiation of a mouse mesenchymal stem cell line on novel chitosan/polyester based scaffolds // Proceedings of the 19th European Conference on Biomaterials (ESB 2005), Sorrento, Italy, 2005. Naples, EffeErreCongressi. 2005. P. 172.
79. S. Sprio. Synthesis and characterization of implants for bone substitutions made of biomedical apatites containing silicon. Esame finale anno. 2008. P. 186.
80. Миронов С.П., Гинцбург А.Л., Еськин Н.А., Лунин В.Г., Гаврюшенко Н.С., Карягина А.С., В.В. Зайцев. Экспериментальная оценка остеоиндуктивности рекомбинантного костного морфогенетического белка (rhBMP-2) отечественного производства, фиксированного на биокомпозиционном материале или костном матриксе // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2010. №4. С.38-43.
81. Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения. М.: ИКЦ «Академкнига». 2006. С. 400.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
Протокол биологических испытаний

Рисунок 1

Подготовка наркотизированных экспериментальных животных

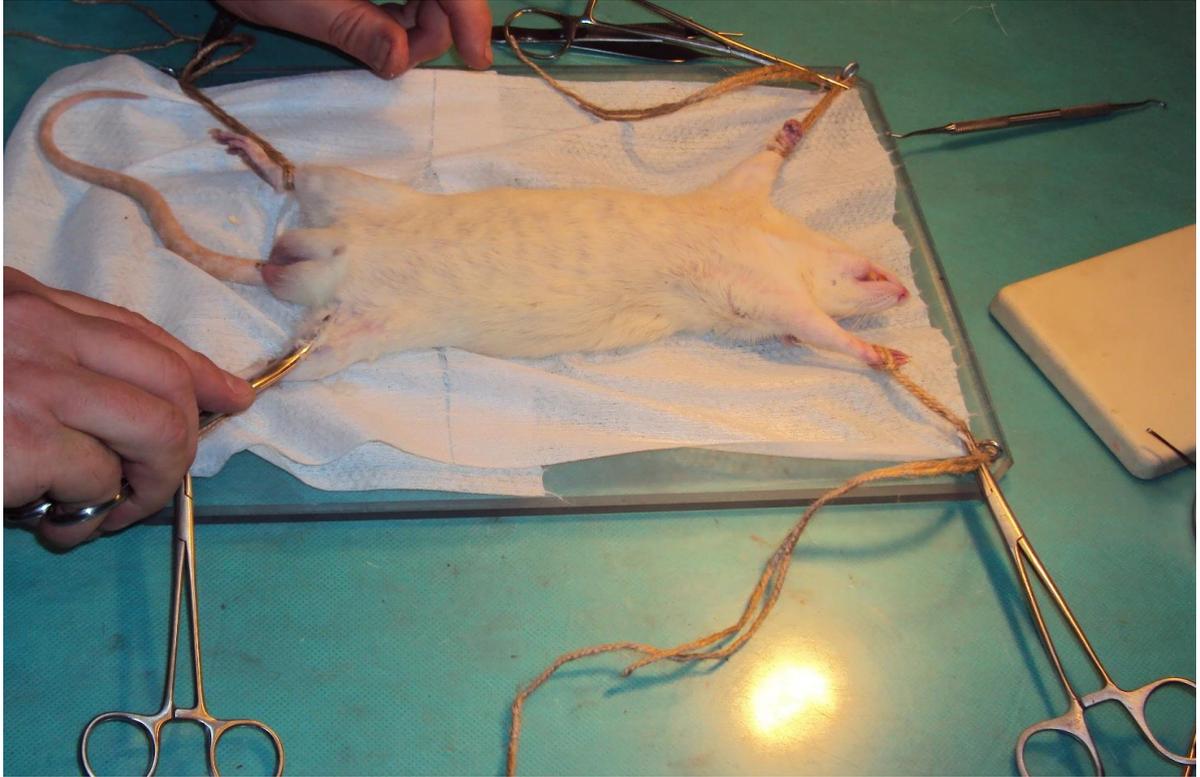


Рисунок 2

Подлготовка анастомоза большеберцовой кости крысы



Рисунок 3

Создание критического дефекта большеберцовой кости крысы

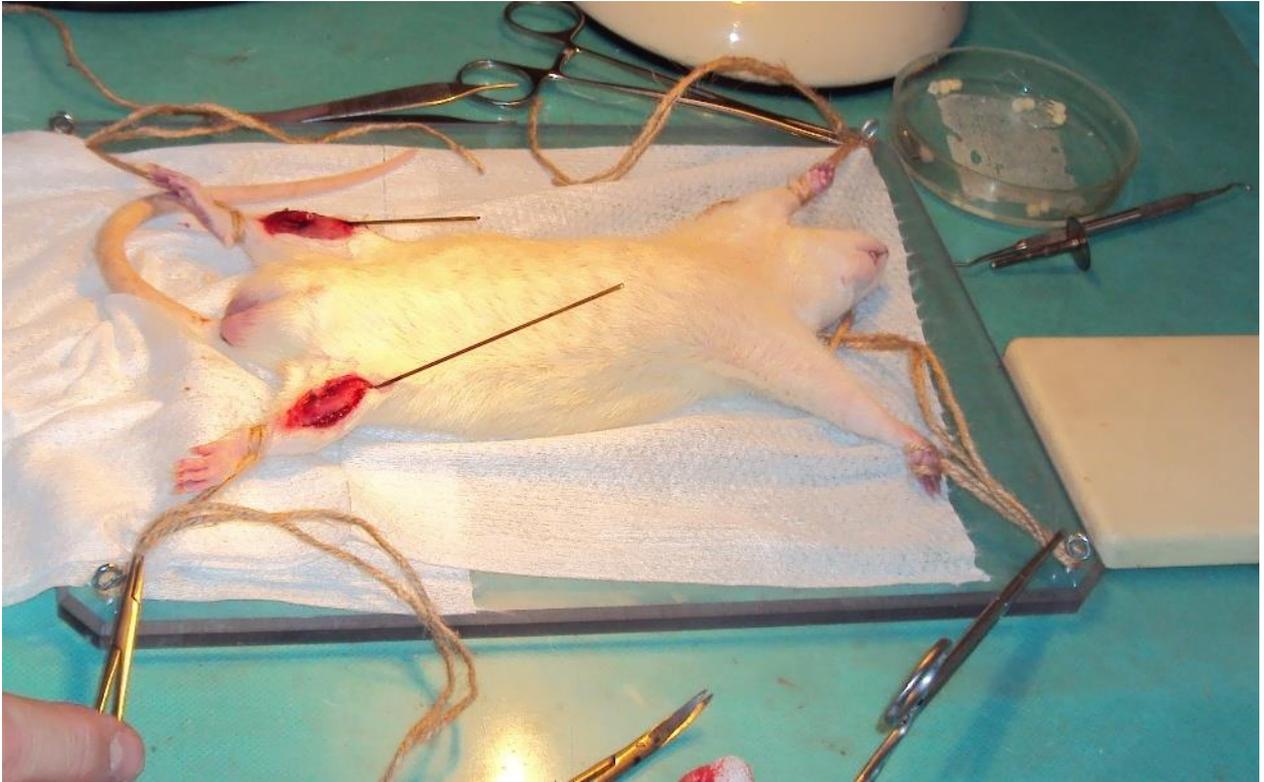


Рисунок 4

Восполнение дефекта исследуемым материалом и фиксация карбоновой спицей



Рисунки 5, 6

Ушивание операционной раны

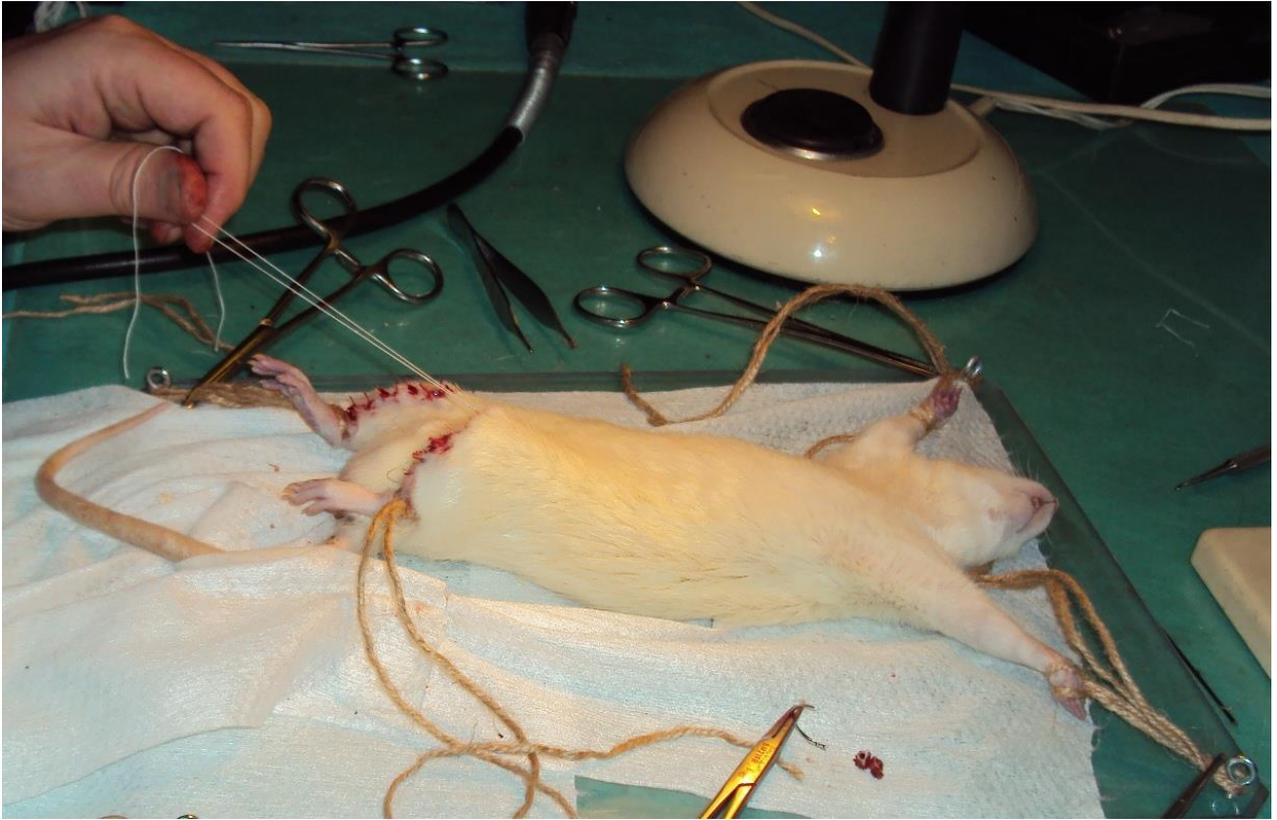


Рисунок 7

Нагноение в месте анастомоза заполненного фосфазенсодержащим материалом



Рисунки 8-11

Исследуемые образцы в сравнении с контрольными (аутопсийный материал)







