

УДК:539.141;537.868;531

МОДИФИЦИРОВАНИЕ ХИТОЗАНА МЕТОДАМИ ХИМИИ ВЫСОКИХ ЭНЕРГИЙ

А.Б.Гильман, Т.С.Демина, Т.А.Акопова, А.Н.Зеленецкий

Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова
Российской академии наук, 117393 Москва, ул. Профсоюзная, 70
E-mail: adam@ispm.ru

Аннотация

Представлен обзор литературы по модификации хитозана методами высокой энергетической химии: под воздействием низко-температурной плазмы, электронных лучей, высокоэнергетических ионов и γ -облучения. Описаны основные методы модификации хитозана и установок, используемых в этих процессах. Рассмотрены некоторые методы для изучения изменения свойств поверхности хитозановых пленок. Представлены данные свидетельствующие о возможности использования модифицированного хитозана в медицине и биотехнологии.

Ключевые слова: плазма, электронные лучи, хитозан, пленки, биотехнология

Введение

Модифицирование биополимеров методами химии высоких энергий является одним из наиболее динамично развивающихся направлений исследований, так как позволяет быстро и в широких пределах варьировать свойства поверхности при сохранении исходных свойств в объеме материала [1]. Возможность направленно изменять химическую структуру, морфологию и другие характеристики поверхности представляет особый интерес при модифицировании материалов для применения в медицине и биотехнологиях.

Хитозан – природный полисахарид, биосовместимый и способный к биodeградации полимер, благодаря наличию в его структуре первичных аминогрупп обладающий разнообразными ценными биохимическими свойствами: биоадгезивностью, бактерицидным эффектом по отношению ко многим видам бактерий, способностью поддерживать процессы хондрогенеза и заживления ран и т.п.

В настоящем обзоре литературы мы попытались суммировать результаты исследований по обработке хитозана методами химии высоких энергий за последние годы и отразить основные направления их развития в данной области.

Хитозан. Химическая структура, свойства и области применения

Хитин и хитозан, который является продуктом его дезацетилирования, относятся к

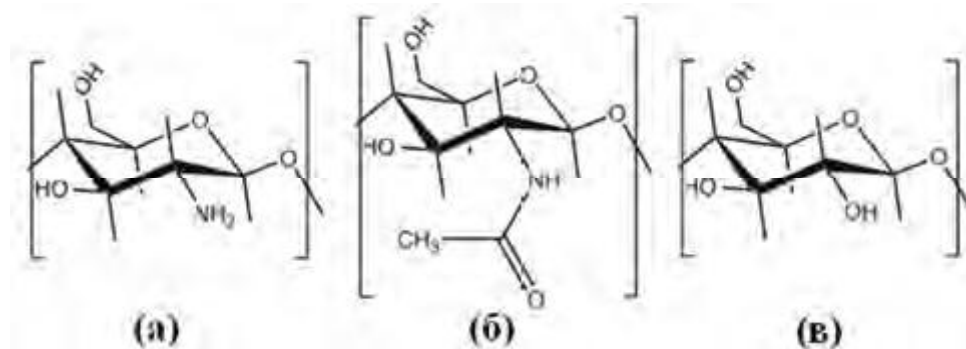
полисахаридам, одной из групп биологических макромолекул. По распространенности в природе хитин не уступает целлюлозе и выполняет структурные и разнообразные биологические функции в тканях живых организмов [2]. Его источниками в природных условиях служат панцири ракообразных, остовы моллюсков и насекомых, некоторые виды грибов (содержание хитина 10–20%). Хитозан как таковой в природе практически не встречается, его получают химическим путем.

Производство хитозана в 2010 г. на мировом рынке оценивалось в 13.7 тыс. тонн с ростом производства к 2015 г. до 21.4 тыс. тонн [3].

Основное структурное звено – 2-амино-2-дезоксид- β -D-глюкоза (глюкозамин) – соединено в макромолекуле хитозана 1,4- β -гликозидной (ацетальной) связью (рис. а). Наряду с глюкозоаминными звеньями в состав полимерной цепи могут входить звенья N-ацетилглюкозамина (хитин) (рис. б) и около 10% 2-дезоксид- β -D-глюкозы (рис. в).

Полимер, содержащий не менее 70% основных (дезацетилированных) звеньев, растворим в одноосновных разбавленных минеральных и органических кислотах и способен к биodeградации в организме под действием неспецифических ферментов, например, лизоцима.

В зависимости от источников получения хитина, молекулярная масса (ММ) которого *in vivo* достигает миллиона и выше, и способов его дезацетилирования заметно различаются физико-химические свойства хитозана, в частности его ММ,



2-амино-2-дезокс-β-D-глюкоза (а),
2-ацетиамидо-2-дезокс-β-D-глюкоза (б) и
β-D-глюкоза (в)

Структурные формулы (поли 1→4) звеньев, входящих в состав хитозана

степень кристалличности, степень полидисперсности макромолекул и содержание в них основных структурных звеньев [4].

Хитозан является природным катионным полиэлектролитом, что определяет его биохимические свойства, такие как бактериостатическая и противовирусная активность, высокая сорбционная способность по отношению к ионам переходных металлов, жирам, белкам и ферментам.

Одной из природных функций хитозана является ингибирование радикальных процессов, обусловленное захватом активных радикалов вторичными спиртовыми и свободными аминогруппами и распадом образующихся неактивных радикалов. Способность хитозана к биodeградации *in vivo* и биоадгезивность позволяют широко использовать его в качестве разнообразных матриц для тканевой инженерии.

В настоящее время основными областями применения хитозана являются медицина, косметическая и фармацевтическая промышленность, экология, биохимия и биотехнология, в том числе некоторые направления генной инженерии, агрохимия и пищевая промышленность.

Химическое модифицирование хитозана

Хитозан можно модифицировать химически с проведением О- и/или N-замещения. Направление реакций зависит от условий их проведения. В кислотной среде или без катализаторов протекают, в основном, реакции по аминогруппам полимера.

В щелочной среде реакционная способность гидроксильных групп выше. Возможность получения как не избирательно замещенных, так и направленно О-или N-замещенных производных хитозана, позволяет реализовать широкий спектр его химических превращений и получать разнообразные по строению и свойствам материалы, что стимулирует исследования в этом направлении [5]. Химическое модифицирование хитозана позволяет улучшать его растворимость в различных средах, повышать механические характеристики изделий на его основе и способствует проявлению новых биологических свойств.

Одним из распространенных методов модифицирования является прямая сополимеризация виниловых мономеров с хитозаном [6]. В большинстве случаев синтез производных хитозана осуществляют в гомогенных или гетерогенных условиях с применением растворителей или органических разбавителей [7]. Существует также ряд работ по химическому модифицированию хитозана при воздействии давления со сдвигом на твердые реакционные смеси, этот метод основан на активации реагентов за счет образования центров взаимодействия (радикалы, ионы, свободные электроны), которые наблюдают и при высокоэнергетическом радиационном воздействии на полимеры [8]. Наиболее эффективным способом придания хитозану растворимости в водной и органической средах, позволяющим при этом сохранить его биохимические свойства, является прививка на цепь-основу полисахарида синтетических полимеров с различной гидрофильностью [9].

Модифицирование хитозана в плазме

Для модифицирования хитозана в плазме используют разряды в газовой (азот, воздух, кислород, инертные газы) и жидкой (водный раствор) фазах. Частота тока разряда может быть различной – применяют низкочастотный, высокочастотный (ВЧ-, 13.56 МГц) и микроволновый (СВЧ-, 2.45 ГГц) разряды, а также разряд постоянного тока. Установки могут быть как экспериментальными, так и промышленного производства – March PX-500 (США), Plasma Prep5 (Германия), Plasma Lab 80Plus (Великобритания), Плазма 600-Т (Россия) и DL-01 (Китай).

Модифицирование в плазме приводит, в основном, к изменению свойств поверхности хитозановых пленок и мембран. Оценку гидрофильно-гидрофобного баланса проводят путем измерения краевых углов смачивания и расчетов поверхностной энергии и ее компонентов. Для изучения морфологии используют методы сканирующей электронной (СЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ), а для исследования химической структуры поверхности – методы Фурье-ИК-спектроскопии и рентгенофотоэлектронной спектроскопии (РФЭС).

Обработка поверхности хитозана в плазме в течение короткого времени (30 с – 10 мин) приводит к увеличению гидрофильности и снижению краевого угла смачивания по воде с 60–100°, характерных для исходных пленок и мембран, до практически полного растекания ($\theta = 11\text{--}12^\circ$). Наблюдается весьма существенное увеличение полной поверхностной энергии, в основном, за счет роста ее полярного компонента. Другим направлением может быть гидрофобизация поверхности пленки хитозана, например, с помощью полимеризации в плазме гексаметилдисилазана.

Согласно данным АСМ обработка поверхности хитозана в плазме может приводить как к увеличению, так и к снижению шероховатости поверхности. Изменения морфологии зависят от ряда факторов: частоты тока разряда, природы рабочего газа и длительности обработки. Следует отметить, что морфология исходных пленок также различается, что связано, по-видимому, как с макромолекулярными характеристиками полисахарида, так и с условиями формования пленочных материалов. Плазмохимическое модифицирование, влияя преимущественно на аморфные домены

образца, приводит к различным морфологическим изменениям в зависимости от параметров исходного образца и условий обработки.

Исследование влияния обработки в плазме на химическую структуру поверхности пленок и мембран хитозана методами ИК-спектроскопии и РФЭС показало, что основными факторами, являются природа рабочего газа и длительность обработки. Например, при использовании плазмы азота и аргона, уменьшается количество групп С–О, отнесенных к пику при 286.6 эВ [10]. При обработке в плазме O₂ увеличивается количество кислородсодержащих групп [11].

Применение плазмохимической обработки в биомедицинских целях

Основная часть работ связана с влиянием плазмохимической обработки пленок хитозана на адгезию и рост клеток *in vitro* на их поверхности. Взаимодействие клеток с материалом в первую очередь определяется сорбцией белков на его поверхности и зависит сразу от нескольких параметров – от химической структуры поверхности, ее заряда, морфологии и др., поэтому трудно установить прямую корреляцию между условиями обработки в плазме и их влиянием на биосовместимость. Так, обработка в ВЧ-разряде с использованием в качестве рабочих газов N₂ и Ar в большинстве случаев положительно влияет на адгезию и рост клеток мышинных фибробластов L929 [10], фибробластов кожи человека [12] и клеток мышинных остеобластов MC3T3-E1 [13]. В [14] отмечена разница в адгезии клеток в зависимости от природы рабочего газа – обработка в аргоне увеличивает адгезию фибробластов кожи человека F1544 на 20–30%, а использование азота приводит к ее снижению. Исследование жизнеспособности клеток L929 на обработанных в плазме пленках хитозана [10] показало различие в зависимости от длительности обработки в плазме аргона или азота.

Обработку в плазме используют для прививки на поверхность хитозана дополнительных компонентов. Например, для получения матриксов для регенерации нервной ткани на предварительно обработанные в плазме кислорода пленки и волокна из хитозана был иммобилизован ламинин [15]. В работе [16] на обработанные в плазме кислорода мембраны хитозана прививали эфир метакриловой кислоты и метоксигексоэтиленгликоля, что по-

звоило улучшить адгезию клеток эпителия роговицы человека. В [17] проведено исследование влияния природы компонента, прививаемого на обработанный в плазме хитозан, на морфологию и рост клеток остеосаркомы человека SaOs-2.

В работе [18] исследовано влияние тлеющего разряда (13.56 МГц, N₂, 15 мин) на последующий ферментативный гидролиз пленок хитозана и их гемостатическую активность. Изучение влияния обработки порошка хитозана в СВЧ-разряде (2.45 ГГц, рабочие газы Ar, NH₃, NH₃/He) на свертываемость крови показало, что воздействие плазмы в среде смеси NH₃/He после предварительной обработки в разряде O₂ приводило к уменьшению времени свертывания крови на 55.2% [11]. Использование ВЧ-разряда в атмосфере гидразина (13.56 МГц, 100 Вт, 30 мин) привело к существенному увеличению антибактериальной активности хитозана по отношению к грамположительным бактериям (*Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*), при этом заметной супрессии грамотрицательных бактерий не наблюдалось [19].

Приведенные результаты показывают несомненную перспективность данного подхода для модифицирования материалов на основе хитозана. Однако, значительное количество переменных параметров обработки (тип разряда, сила тока, вид газа, давление в газовой фазе, время обработки и т.д.) и неоднозначность их влияния, а также многочисленность факторов, ответственных за биоактивность материала, требуют систематических исследований для качественного прогнозирования эффекта обработки в плазме.

Модифицирование хитозана с помощью γ -облучения

γ -Облучение используют, в основном, для получения низкомолекулярного хитозана из природных объектов (хитина и хитозана), выделенных, например, из панцирей крабов, креветок и т.п.

Так, методами ГПХ, Фурье-ИК- спектроскопии и ЭПР было показано, что при γ -облучении хитозана, полученного из хитина, дозой 300 кГр величина среднего молекулярного веса уменьшалась от 690000 до 20900 Да с сохранением химической структуры и снижением полидисперсности [20]. С помощью γ -облучения были получены наноразмерные

частицы хитозана (1–100 нм) при одновременном уменьшении его молекулярного веса [21].

Прививка под воздействием малых доз γ -облучения (до 20 кГр) на поверхность хитозана специфических мономеров, в частности, 2-гидроксиэтилметакрилата, заметно повышала биосовместимость с кровью и приводила к изменению физико-химических свойств поверхности [22].

Воздействие высокоэнергетических ионов

Для модифицирования хитозана применяют воздействие высокоэнергетических ионных пучков – процесс иммерсионной ионной имплантации, приводящий, в зависимости от энергии пучка, к уменьшению молекулярной массы хитозана (энергия пучка МэВ) и образованию зарядовых состояний (энергия пучка кэВ), обеспечивающих улучшение адсорбционных, медико-биологических и разделительных свойств пленок и мембран на его основе. Используют, как правило, пучки протонов с энергией 30 МэВ [23], а также ионов аргона, азота и кислорода с энергией 15–120 кэВ [24]. При облучении пучком протонов [23] (циклотрон MC-50 Scanditronics Co., Sweden, энергия 30 МэВ, ток 50 нА, время обработки 5–10 мин) дисков, полученных прессованием порошка хитозана, наблюдали уменьшение его молекулярной массы до 2–3 раз с одновременным заметным увеличением полидисперсности.

Значительное изменение адсорбционных и медико-биологических характеристик мембран из хитозана в результате облучения пучком ионов азота или аргона (энергия 15–25 кэВ, доза 10^{13} – 10^{15} ионов/см², давление 10 Па) было показано на примере прикрепления клеток фибробластов кожи человека F1544 [14]. Было найдено, что облучение ионами Ar приводит к увеличению адсорбции клеток, а ионами азота – к ее уменьшению.

Воздействие пучка электронов

Воздействие электронных пучков (обычно сканирующий ускоритель электронов Cockcroft–Walton, 2 МэВ) используют, в основном, для получения композитных гидрогелей на основе хитозана [25]. Такие композиты были получены с поливиниловым спиртом, крахмалом и активированным углеродом, они обладали существенно лучшими механическими и антибактериальными свойствами. Бы-

ло также показано [26], что при облучении хитозана электронами с энергией ~ 5 эВ гидроксильные группы оказываются более устойчивыми, чем амино/амидные группы. Вероятно, наличие реакционно-способных боковых групп защищает основную полисахаридную цепь от деструкции. В то же время, облучение высокоэнергетическим электронным пучком приводит к существенному снижению молекулярного веса хитозана и увеличению растворимости [27]. Так, воздействие пучка электронов с энергией 20–250 кГр на порошок хитозана с $MM = 710000$ Да приводит к снижению MM полимера до 10 раз.

Заключение

Приведенные данные свидетельствуют, что модифицирование хитозана различными методами химии высоких энергий несомненно перспективно, так как позволяет изменять его структуру и свойства, расширять области применения, в том числе в медицине и биотехнологиях. Следует, однако, отметить, что в силу междисциплинарного характера, во многих работах уделяют недостаточно внимания условиям проведения обработки или характеристикам используемого хитозана. К сожалению, работы по модифицированию хитозана методами химии высоких энергий, представленные в настоящее время в литературе, направлены, в основном, на получение практического эффекта и часто не отражают важности фундаментального исследований в этой области.

Литература

1. Bauer S., Schmuki P., von der Mark K., Park J. // *Prog. Mater. Sci.* **2013**. V. 58. p. 261.
2. Хитин и хитозан: природа, получение и применение / Под ред. Варламова В.П., Немцева С.В., Тихонов В.Е. М.: РХО. 2010. 292 с.
3. Хитозан / Под ред. Скрябина К.Г., Михайлова С.Н., Варламова В.П. М.: Центр «Биоинженерия» РАН. 2013. С. 3.
4. Rege P.R., Block L.H. // *Carbohydr. Res.* 1999. V. 321. p. 235.
5. Polysaccharides: Development, properties and applications / Tiwari A. (Eds). NY.: Nova Science Publishers. 2010. p. 151.
6. Sashiwa H., Yamamori N., Ichinose Y., Sunamoto J., Aiba S. // *Biomacromolecules*. 2003. V. 4. p. 1250.
7. Mourya V.K., Inamdar N.N. // *React. & Funct. Polym.* 2008. V. 68. p. 1013.
8. Focus on Chitosan Research / A.N. Ferguson, A.G. O'Neill (Eds.). N.Y.: Nova Science Publishers. 2011. p. 223.
9. Polysaccharides: Development, Properties and Applications / Tiwari A. (Ed.). N.Y.: Nova Science Publishers Inc. 2010. p. 113.
10. Silva S. S., Luna S. M., Gomes M. E., Benesch J., Pashkuleva I., Mano J. F., Reis R. L. // *Macromol. Bioscience*. 2008. V. 8. p. 568.
11. Ogino A., Kral M., Yamashita M., Nagatsu M. // *Appl. Surf. Sci.* 2008. V. 255. p. 2347.
12. Zhu X., Chian K. S., Chan-Park M. B. E., Lee S. T. // *Biomed. Mat. Res. A*. 2005. V. 73. p. 264.
13. Hsu S., Lin C.H., Tseng C.-S. // *Biofabrication*. 2012. V. 4. № 1. doi:10.1088/1758-5082/4/1/015002.
14. Saranwong N., Inthanon K., Wongkham W., Wanichapichart P., Suwannakachorn D., Yu L.D. // *Nucl. Instrum. & Meth. B*. 2012. V. 272. p. 386.
15. Hsu S.-H., Kuo W.-C., Chen Y.-T., Yen C.-T., Chen Y.-F., Chen K.-S., Huang W.-C., Cheng H. // *Acta Biomaterialia*. 2013. V. 9. p. 6606.
16. Yin S., Ren L., Wang Y. // *Plasma Sci. & Techn.* 2013. V. 15. p. 1041.
17. Lopez-Perez P.M., Marques A. P., da Silva R.M.P., Reis R.L., Pashkuleva I. // *J. Mater. Chem.* 2007. V. 17. p. 4064.
18. Rao S. B., Sharma C. P. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1997. V. 34. p. 21.
19. Uygun A., Kiristi M., Oksuz L., Manolache S., Ulusoy S. // *Carbohydr. Res.* 2011. V. 346. p. 259.
20. Gryczka U., Dondi D., Chmielewski A.G., Migdal W., Buttafava A., Faucitano A. // *Radiat. Phys. & Chem.* 2009. V. 78. p. 543.
21. Pasanphan W., Rimdusit P., Choofong S., Piroonpan T., Nilsuwankosit S. // *Radiat. Phys. & Chem.* 2010. V. 79. p. 1095.
22. Casimiro M.H., Gil M.H., Leal J.P. // *Intern. J. Pharmaceut.* 2010. V. 395. p. 142.
23. Kim M.-S., Choi Y.-J., Park H.-S., Noh I. // *J. Phys. & Chem. Solids*. 2008. V. 69. p. 1569.
24. Inthanon K., Saranwong N., Wongkham W., Wanichapichart P., Prakrajang K., Suwannakachorn D., Yu L.D. // *Surf. & Coat. Tech.* 2012. V. 229. p. 112.

25. Zhao L., Mitomo H., Zhai M., Yoshii F., Nagasawa N., Kume T. // Carbohydr. Polym. 2003. V. 53. p. 439.

26. Ryzhkova A., Jarzak U., Schafer A., Baumer M., Swiderek P. // Carbohydr. Polym. 2011. V. 83. p. 608.

27. Chmielewski A.G., Migdal W., Swietoslawski J., Swietoslawski J., Jakubaszek U., Tarnowski T. // Radiat. Phys. & Chem. 2007. V. 76. p. 1840.

MODIFICATION OF CHITOSAN BY METHODS OF HIGH ENERGY CHEMISTRY

A.B.Gilman, T.S.Demina, T.A.Akopova, A.N.Selenetskii

Institute of synthetic polymer materials them. N.S. Enikolopova
The Russian Academy of Sciences, 117393 Moscow, Profsoiuznaya str., 70
E-mail: adam@ispm.ru

Abstract

The review of the literature on modification of chitosan by methods of high energy chemistry: under the influence of low-temperature plasma, electron beams, high-energy ions and γ -irradiation was carried out. The main techniques of chitosan modification and the installations used in these processes were described. Some methods for studying the changes of the chitosan film surfaces were considered. The data testify the possibility of modified chitosan using in medicine and biotechnology were submitted.

ХИМИЯЛЫҚ ЖОҒАРЫ ЭНЕРГИЯНЫ ХИТОЗАН ӘДІСТЕРІМЕН ТҮРЛЕНДІРУ

А.Б.Гильман, Т.С.Демина, Т.А.Акопова, А.Н.Зеленецкий

Ениколопова Н.С. атындағы синтетикалық полимер материалдар институты.
Ресей ғылым академиясы, 117393 Мәскеу, көше. Профсоюзная, 70

Аннотация

Жоғары энергетикалық химияны хитозан әдістерін түрлендіру жайындағы әдеби шолу ұсынылған: төмен температуралы плазма әсерімен, электронды саулелер, жоғары энергиялы иондары және γ -сәуле. Осы процестерде пайдаланылатын хитозан түрлендіру әдістері негізі жазылған және орындалған. Хитозан қабықтардың беттік қасиеттеріне өзгерістер зерттеу үшін бірнеше әдістер қарастырылған. Медицина және биотехнологияда түрлендірілген Хитозан пайдалану мүмкіндігі туралы деректер көрсететілген.