

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНЫХ СШИВАЮЩИХ АГЕНТОВ ДЛЯ
ЖЕЛАТИНОВОГО ПОКРЫТИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМОГО В МЕДИЦИНЕ

Автор:

Фомина Дарья Сергеевна,
Россия, Кировская область, г. Киров,
КОГОАУ ЛЕН, 8 класс

Научные руководители:

Широкова Евгения Сергеевна,
Россия, Кировская область, г. Киров,
к.х.н., доцент каф. химии и технологии переработки
полимеров ВятГУ

Товстик Евгения Владимировна,
Россия, Кировская область, г. Киров,
к.б.н., доцент каф. фундаментальной химии и
методики обучения химии ВятГУ,
научный сотрудник ФАНЦ Северо-Востока

Содержание

Введение.....	3
1 Обзор литературы	4
2 Методики исследований.....	6
2.1 Приготовление растворов желатина и сшивающего агента.....	6
2.2 Получение пленочных материалов поливом из раствора.....	7
2.3 Характеристика внешнего вида пленочных материалов	7
2.4 Методика определения физико-механических показателей пленочных материалов	7
2.5 Методика оценки кинетики набухания пленочных материалов.....	7
2.8 Оценка паропроницаемости желатиновых пленок.....	8
2.9 Оценка биологической активности желатиновых пленок.....	8
3 Исследование безопасных сшивающих агентов для желатинового покрытия, используемого в медицине	8
Выводы.....	13
Список литературы	14

Введение

На сегодняшний день при производстве нетканых протезов аорты и крупных артериальных сосудов, выполненных в виде трубки, их внутренняя поверхность покрывается составом на основе коллагена или желатина сшитого глутаровым альдегидом. Желатин/коллаген и иные вводимые лекарственные средства обеспечивают покрытие биосовместимость, тромборезистентность, а глутаровый альдегид, выступая в качестве сшивающего агента, – достаточную механическую прочность и заданную скорость высвобождения лекарственного препарата (при его наличии). В качестве сшивающего агента глутаровый альдегид популярен из-за его коммерческой доступности, низкой стоимости и высокой реакционной способности. Несмотря на широкое использование глутарового альдегида имеются опасения относительно его потенциальной цитотоксичности и того, что он вызывает кальцификацию тканей. Кроме того, необходима очистка готового изделия от остатков глутарового альдегида.

В связи с этим в настоящее время актуален поиск иных сшивающих агентов, которые обеспечат покрытие биосовместимость, отсутствие цитотоксичности, требуемые физико-механические показатели, контролируемое высвобождение лекарственных препаратов, стабильность при хранении.

Целью данной работы является исследование и сравнительная характеристика различных сшивающих агентов для желатина, а также получение пленочных материалов с их использованием и оценка их эффективности.

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

1. Приготовить композиции, содержащие разные типы и количества сшивающего агента, получить пленочные материалы на их основе.
2. Оценить внешний вид, растворимость, паропроницаемость и физико-механические показатели полученных пленочных материалов:
3. Оценить кинетику набухания (определяет скорость высвобождения лекарственного препарата) и биологическую активность (косвенно позволяет оценить цитотоксичность) полученных пленочных материалов.
4. Выбрать наиболее перспективный состав композиции.
5. Рассмотреть направления дальнейшей работы.

Объектом исследования являются композиции на основе желатина, содержащие лимонную кислоту и альгинат натрия в качестве сшивающего агента.

Предмет работы – исследование и сравнительная характеристика различных сшивающих агентов для желатина, а также получение пленочных материалов с их использованием и оценка их эффективности.

При проведении исследования были использованы **методы**: описание внешних особенностей и кинетики набухания, оценка паропроницаемости

полученных пленочных материалов, оценка их физико-механических показателей, оценка биологической активности.

Гипотеза – с использованием альгината натрия и/или лимонной кислоты можно получить желатиновые покрытия для использования в медицине, обладающие биосовместимостью, отсутствием цитотоксичности, достаточной механической прочностью и другими целевыми характеристиками.

1 Обзор литературы [1-8]

Желатин представляет собой соединение, которое получают гидролизом коллагена и которое практически не отличается от него по аминокислотному составу, но состоит из полностью денатурированного белка.

Желатин млекопитающих получают из коллагена, который является основным компонентом соединительной ткани и костей позвоночных животных. Рыбий желатин получают из кожи и костей рыб.

Главными свойствами желатина и получаемых из него продуктов являются растворимость в нагретых водных растворах и способность к образованию плотных гелей при температуре ниже 40 градусов.

Желатин тяжелее воды; в холодной воде разбухает, при нагревании растворяется. После продолжительного кипячения желатин теряет способность образовывать студень.

Желатин широко используется в медицине, пищевой промышленности, косметической промышленности, биотехнологии и биоинженерии, текстильной и кожевенной промышленности.

Остановимся более подробно на использовании желатина в медицинской и фармацевтической промышленности.

В данных отраслях промышленности он широко используется благодаря его биосовместимости, биоразлагаемости, неиммуногенности и коммерческой доступности. В фармацевтической промышленности желатин используется при производстве лечебных сывороток, биологических растворов для внутривенного введения. Желатин – один из компонентов среды для проведения бактериологических анализов, производства биомедицинских тест-систем и косметики.

Желатин может поглощать в 5-10 раз больше своей массы воды и является основным ингредиентом твердых и мягких капсул в фармацевтической промышленности, поскольку желатин плавится при температуре выше 30°C и легко выделяет биологически активные соединения, питательные вещества и лекарственные средства в пищеварительном тракте человека. Наибольшая доля желатина, используемая в фармацевтической промышленности, главным образом, применяется для изготовления твердых и мягких желатиновых капсул, а также для таблетирования, покрытия таблеток, грануляции, капсулирования, микроинкапсулирования и предотвращения окисления.

Гидрогели на основе желатина находят применение в доставке лекарственных веществ, тканевой инженерии и изготовлении контактных линз, так как способны стимулировать клеточную адгезию и рост. Кроме того, эти гидрогели можно использовать в качестве перевязочных материалов для лечения ран благодаря их способности к поглощению жидкости.

Гидрогели на основе желатина используются также в качестве перевязочных материалов для лечения ран. Перевязочные материалы для ран должны обеспечивать теплую и влажную среду для быстрого процесса заживления, кроме того, они должны предотвращать размножение бактерий вокруг области раны. Следовательно, гидрогели для перевязки ран с биоразлагаемой способностью, хорошей абсорбцией жидкости, прозрачностью и оптимальной проницаемостью для водяного пара являются предпочтительными по сравнению с предварительно отформованными перевязочными материалами (например, коммерческими перевязочными материалами в виде мембран и листов) для процесса заживления ран.

Самостоятельные изделия на основе желатина в виде пленочных композиций, мембран, капсул, гелей, порошков, губок используются в хирургии, стоматологии, оториноларингологии, офтальмологии, гинекологии, проктологии, андрологии, дерматологии в качестве систем доставки лекарственных веществ направленного действия, гемостатических, ранозаживляющих средств, средств для профилактики осложнений после хирургических вмешательств.

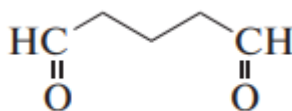
Также желатин используется для создания биорезорбируемых покрытий поверхности имплантируемых изделий (протезы кровеносных сосудов, кардиохирургические заплатки, протезы клапанов сердца, стенты, электроды для электрокардиостимуляторов, экстракорпоральные устройства, кавальтеры) с целью улучшения функциональных свойств этих изделий (тромборезистентных, антимикробных, нулевой хирургической пористости — при необходимости, оптимальных физико-механических характеристик)

Для придания материалам на основе желатина (капсулам, пленкам, покрытиям) эластичности в их состав вводят глицерин, представляющий собой трехатомный спирт. Также для перевода полимерной композиции в водонерастворимое состояние и для обеспечения заданных сроков биодеградации желатин подвергают сшиванию (структурированию).

Способы структурирования различны: обработка композиции химическими сшивающими агентами (альдегиды, изоцианаты, карбодиимиды, эпоксины, ангидриды, генипин и др.), термообработка.

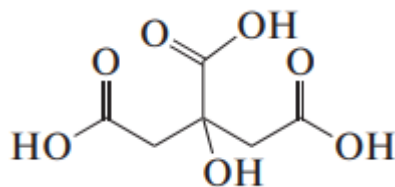
Основные сшивающие агенты для коллагена (желатина), их характеристика представлены ниже.

Глутаровый альдегид



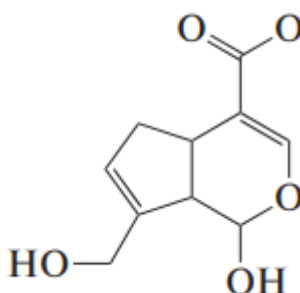
Альдегид реагирует с первичными аминогруппами остатков (гидроксил)-лизина в молекуле желатина с образованием промежуточных оснований Шиффа, которые затем превращаются в стабильные и сложные поперечные связи.

Карбоновые кислоты (лимонная кислота)



Карбоновые кислоты могут реагировать с гидроксильными и аминогруппами и, следовательно, сшивать как полисахариды, так и белки.

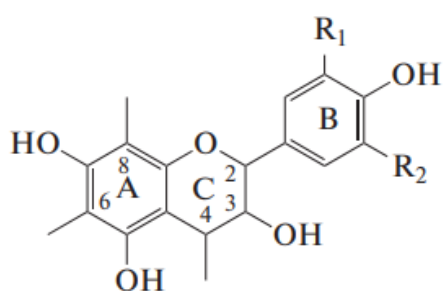
Генипин



Механизм реакции генипина с аминогруппами довольно сложен и зависит от значения pH.

Имиды (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC)). Карбоксильные группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот желатина вступают в реакцию с EDC с образованием интермедиатов изоацилмочевины.

Проантоцианидины – растительные полифенолы.



R₁, R₂ = H (пропеларгонидины);
R₁ = H, R₂ = OH (процианидины);
R₁, R₂ = OH (продельфинидины)

Механизм сшивания включает в себя ковалентные, ионные, водородные связи и гидрофобные взаимодействия.

Ферменты (лизилоксидаза, трансглутаминаза). Обладают низкой токсичностью и иммуногенностью, в отличие от химических и физических способов

2 Методики исследований

2.1 Приготовление растворов желатина и сшивающего агента

Приготовление растворов осуществлялось следующим образом. Желатин и сшивающий агент (альгинат натрия и лимонная кислота) в

заданном соотношении растворяли в дистиллированной воде. Раствор нагревали на водяной бане до полного растворения в течение 30 мин. После этого в приготовленную смесь добавляли глицерин (чтобы пленка была более мягкой и эластичной), смесь перемешивали. Для удаления растворенных пузырьков раствор отстаивался в течение 30 мин.

2.2 Получение пленочных материалов поливом из раствора

Заданный объем приготовленных растворов (10 мл) отливали в заранее подготовленные силиконовые формы (размером 4x11,5 см) и сушили при комнатной температуре в течение не менее 72 часов.

2.3 Характеристика внешнего вида пленочных материалов

Характеристику полученных пленок проводили по следующим показателям: цвет (прозрачность, описание цвета); запах (наличие/отсутствие); гибкость (степень гибкости в сравнении с контролем).

2.4 Методика определения физико-механических показателей пленочных материалов

Механические свойства определяют поведение тела под действием приложенного к нему усилия. Численно это поведение оценивается прочностью и деформируемостью.

Прочность характеризует сопротивление материалов разрушению под действием внешних сил, характеризующихся предельным для данного режима нагружения напряжением, при котором происходит разрушение.

Деформируемость – это изменение размеров тела, вызванное приложенной к нему нагрузкой.

Под разрушением полимера понимается разрыв его на части (нарушение сплошности), т.е. разрушение – процесс, приводящий к образованию новых поверхностей раздела. Процесс разрушения ускоряется присутствующими в воздухе кислородом, озоном, диоксидом азота и т.п.

Физико-механические показатели (прочность при растяжении и удлинение при разрыве) каждой плёнки оценивали на разрывной машине AG-X5 («Shimadzu», Япония) при комнатной температуре и скорости движения активного захвата 100 мм/мин. Для исследования вырезали образцы плёнок размером 1×5 см; образцы растягивали в вертикальном направлении. Испытания проводили на 3 образцах и рассчитывали средние значения.

2.5 Методика оценки кинетики набухания пленочных материалов

Абсорбционные свойства (кинетику набухания) определяли гравиметрическим методом по характеру набухания пленок [9].

Для этого исследуемые образцы желатиновых пленок (два параллельных опыта), размером 1,0×1,0 см помещали в стакан с 50 мл дистиллированной воды. Через 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин. после начала опыта проводили взвешивание образцов. Также взвешивание проводили спустя 24 и 48 часов после начала опыта, если пленочные материалы было возможно извлечь для взвешивания. Степень набухания в воде (X, %) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(m_t - m_0) \cdot 100\%}{m_0} - 100\%,$$

где m_t – масса образца пленки в исследуемый момент времени (г); m_0 – масса пленки до начала опыта (г).

По истечении 48 часов оценивали рН образовавшихся растворов с помощью полосок универсальной индикаторной бумаги ТУ 2642-054-23050963-2008.

2.8 Оценка паропроницаемости желатиновых пленок

О паропроницаемости желатиновых пленок судили по массе водяного пара, прошедшего через образец.

Определение включало в себя следующие этапы [10].

Пробирку объемом 5 см³ наполняли дистиллированной водой (2 см³). Образцы желатиновых пленок герметично закрепляли на горлышке пробирки. Пробирки с желатиновыми пленками помещали в эксикатор, наполненный силикагелем. Через 24 ч производили повторное взвешивание опытных образцов на аналитических весах.

Расчет паропроницаемости желатиновых пленок (q , г/м²) производили по формуле

$$q = \frac{10 \cdot \Delta m}{S \cdot t},$$

где Δm – изменение массы пробирки за исследуемое время (г); S – испытываемая площадь образца (см²); 10 – коэффициент для перевода г/см³ в г/м².

2.9 Оценка биологической активности желатиновых пленок

Оценку биологической активности растворов, используемых для приготовления желатиновых пленок, оценивали по методике, описанной в [11].

В 20 мл анализируемой пробы (раствор для приготовления япленок рабавленный в три раза) вносили 1,36 г сухеных дрожжей, перемешивали, добавляли 0,4 г сахарного песка, разливали по 3 мл в мерные пробирки и инкубировали в течение 15 мин при 30 °С. По истечении этого времени определяли объем образовавшейся пены и вычисляли скорость ее подъема по формуле:

$$v = V/t,$$

где v – скорость подъема пены (мл/мин), V – объем пены, мл, t – время, мин.

Снижение скорости подъема пены рассматривается как ингибирующий, а повышение как – стимулирующий эффект.

3 Исследование безопасных сшивающих агентов для желатинового покрытия, используемого в медицине

Рецептуры поливочных растворов (на объем 100 мл) для получения пленок представлены ниже. Обозначение включает в себя указание на тип сшивающего агента (Ж – нет сшивающего агента; ЛК – лимонная кислота; А – альгинат натрия) и его дозировку (в г/л).

Таблица 1. Рецептатура поливочных растворов

Обозначение раствора	Содержание				
	Дистиллированная вода, мл	Желатин, г	Глицерин, мл	Альгинат натрия, г	Лимонная кислота, г
Ж	85	10	5	-	-
ЛК 0,5	85	10	5	-	0,05
ЛК 1,0	85	10	5	-	0,1
ЛК 2,5	85	10	5	-	0,25
А 0,5	85	10	5	0,05	-
А 1,0	85	10	5	0,1	-
А 2,5	85	10	5	0,25	-

Полученные растворы были прозрачны и имели приемлемый уровень вязкости.

Также была сделана попытка получить растворы, содержащие 5 г/л альгината натрия. Однако полученный раствор имел очень высокую вязкость, что сделало невозможным получение тонких пленок методом полива. Растворы, содержащие 5 г/л лимонной кислоты, не получали, т.к. ранее было показано существенное снижение физико-механических свойств желатиновых пленок, содержащих лимонную кислоту в аналогичных дозировках.

Далее по методике, описанной в п.2.2, были получены пленки толщиной 350 ± 50 мкм.

Внешний вид полученных пленочных материалов и их характеристика представлены ниже. Все полученные пленочные материалы были прозрачными, гибкими, однородными по структуре и не имели специфического запаха.



Рисунок 1. Внешний вид полученных пленочных материалов

Результаты оценки физико-механических характеристик представлены на рисунке ниже.

Как можно видеть во всех вариантах эксперимента удлинение при разрыве пленочных материалов сопоставимы между собой (допустимый разброс по данному показателю составляет $\pm 10\%$). При использовании в качестве сшивающего агента лимонной кислоты отмечается возрастание прочности пленочных материалов с ростом содержания лимонной кислоты. Для пленочных материалов, содержащих альгинат натрия в качестве сшивающего агента, также отмечена тенденция к росту прочности с ростом содержания альгината натрия, однако эта тенденция менее выражена.

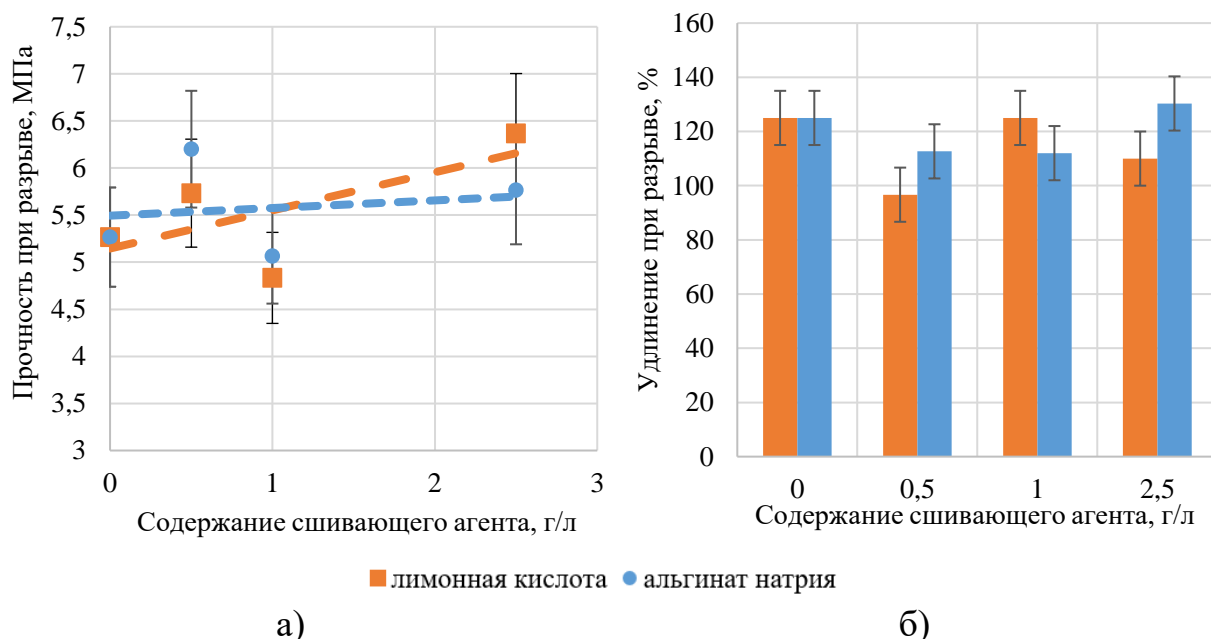


Рисунок 2. Результаты оценки физико-механических свойств пленок, содержащих сшивающие агенты в различных дозировках: а – прочность при растяжении; б – удлинение при разрыве

Результаты оценки паропроницаемости желатиновых пленок представлены в таблице 2. Также была учтена толщина пленочных материалов, использованных в опыте

Таблица 2. Паропроницаемость пленочных материалов

Обозначение пленочного материала	Паропроницаемость за 24 часа, г/м ²	Паропроницаемость за 24 часа, г/м ² /мм
Ж	0,37	1,2
ЛК 0,5	0,40	1,1
ЛК 1,0	0,38	1,1
ЛК 2,5	0,34	1,0
А 0,5	0,28	0,9
А 1,0	0,36	0,9
А 2,5	0,38	0,8

Как можно видеть при использовании сшивающего агента отмечается снижение паропроницаемости пленочных материалов с ростом его содержания.

Кинетика набухания полученных пленок представлена на рисунке. Как можно видеть для составов, содержащих лимонную кислоту в качестве сшивающего агента, в начальный период времени степень набухания сопоставима со степенью набухания желатиновой пленки без сшивающего агента. С увеличением продолжительности наблюдения степень набухания тем меньше, чем больше дозировка сшивающего агента (лимонной кислоты). По прошествии двух суток механическую прочность, достаточную для извлечения образца, сохранили только желатиновые пленки ЛК 2,5.

Для составов, содержащих альгинат натрия в качестве сшивающего агента, с начального периода времени отмечается большая степень набухания, чем для желатиновой пленки без сшивающего агента; чем больше дозировка альгината натрия, тем выше степень набухания. Данный факт связан с тем, что при растворении альгинат натрия способен абсорбировать воды в 300 раз больше собственного веса. По прошествии двух суток механическую прочность, достаточную для извлечения образца сохранили только желатиновые пленки А 1,0 и А 2,5.

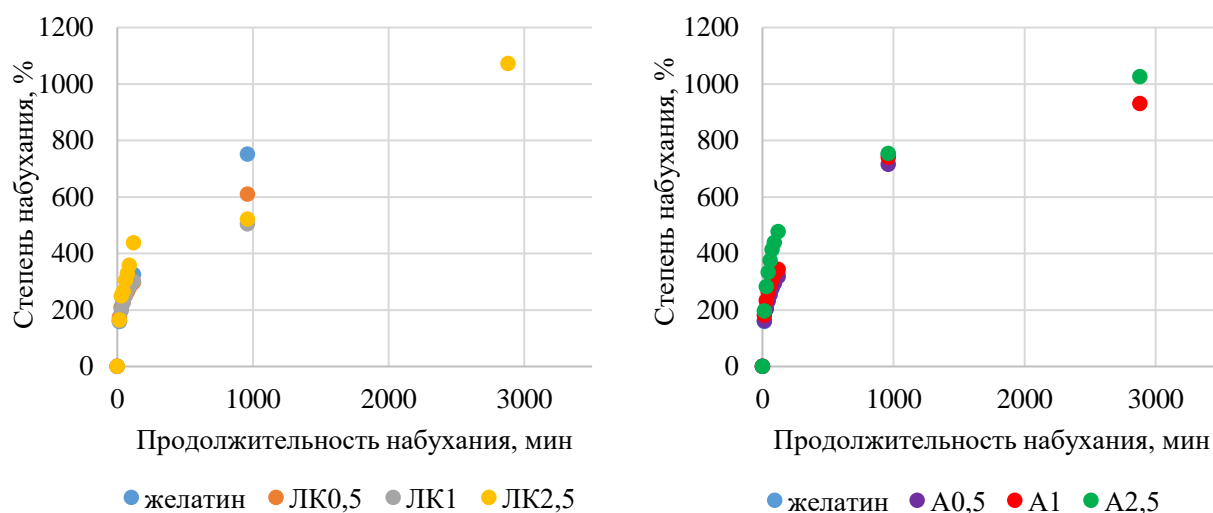
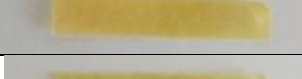
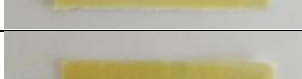


Рисунок 3. Кинетика набухания пленочных материалов

Результаты оценки рН образовавшихся после 48 часов растворов представлены ниже. Нормальный уровень рН кожи на поверхности большинства частей тела варьируется в диапазоне 4,1–5,8, рН различных биологических жидкостей и тканей тела человека – в диапазоне 5,4–8,4. Таким образом образцы, желатиновых пленок, содержащие альгинат натрия в качестве сшивающего агента, не будут изменять рН окружающих тканей, а образцы, желатиновых пленок, содержащие лимонную кислоту в качестве сшивающего агента, могут закислять окружающие ткани.

Таблица 3. Результаты оценки pH

Обозначение раствора	Фото индикаторной полоски	Значение pH
Ж		5
ЛК 0,5		4
ЛК 1,0		4
ЛК 2,5		3
А 0,5		6
А 1,0		6
А 2,5		7

Результаты оценки биологической активности представлены на рисунке 3.

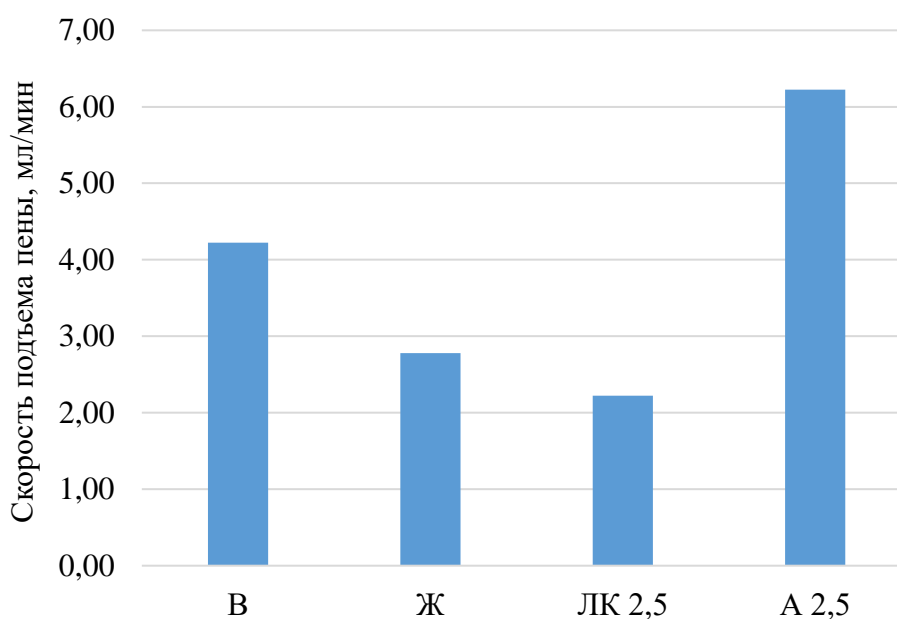


Рисунок 3. Результаты оценки биологической активности

Можно отметить, что для растворов желатина и желатина с лимонной кислотой наблюдается угнетение биологической активности по сравнению с контрольным опытом (В – вода), что связано с тем, что желатин сам по себе обладает антимикробной активностью. Для раствора желатина с альгинатом натрия отмечено стимулирование биологической активности, что может осложнить использование данного состава в медицине.

Выводы

1. Изучена возможность использования альгината натрия и лимонной кислоты в различных дозировках в качестве сшивающего агента для желатиновых пленок взамен применяемого на сегодняшний день глутарового альдегида.

2. Установлено, что при использовании в качестве сшивающего агента альгината натрия полученные пленочные материалы прозрачны, однородны по своей структуре; отмечена слабая тенденция к росту прочности пленок с ростом содержания альгината натрия; для полученных пленок отмечается большая степень набухания. Показано, что желатиновые пленки, содержащие альгинат натрия в качестве сшивающего агента, не изменяют рН окружающих тканей, однако могут стимулировать биологическую активность.

3. Установлено, что при использовании в качестве сшивающего агента лимонной кислоты полученные пленочные материалы прозрачны, однородны по своей структуре; отмечается возрастание прочности, снижение паропроницаемости и степени набухания пленочных материалов с ростом содержания лимонной кислоты. Показано, что желатиновые пленки, содержащие лимонную кислоту в качестве сшивающего агента, понижают рН окружающих тканей, ингибируют биологическую активность.

4. Наиболее перспективными являются пленочные материалы, содержащие в качестве сшивающих агентов лимонную кислоту в концентрации 2,5 г/л и альгинат натрия в концентрации 1 и 2,5 г/л. Варьируя тип и содержание указанных соединений в перспективе можно целенаправленно регулировать скорость высвобождения лекарственного средства из разрабатываемого покрытия.

5. Полученные в работе результаты демонстрируют, что при использовании в качестве сшивающих агентов для желатина безопасных лимонной кислоты и альгината натрия могут быть получены пленочные покрытия (в последующем используемые для покрытия внутренней поверхности протезов аорты и крупных артериальных сосудов) с достаточной механической прочностью, которая сопоставима с используемыми на сегодняшний день. Использование таких покрытий в медицинской практике обеспечит биосовместимость, отсутствие цитотоксичности, требуемые физико-механические показатели, стабильность при хранении. Введение в состав покрытия лекарственных препаратов и подбор соответствующей концентрации сшивающего агента позволит осуществлять контролируемое высвобождение препарата.

6. Дальнейшая работа может быть направлена на подбор лекарственного препарата (модельного соединения) и разработку методики экспресс-оценки высвобождения лекарственного препарата из разработанных пленочных материалов.

Список литературы

1. Технология полимеров медико-биологического назначения. Полимеры природного происхождения [Электронный ресурс] : учебное пособие / М. И. Штильман [и др.] ; под ред. М. И. Штильмана. — 2-е изд. (эл.). — Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf :331 с.). — М. : Лаборатория знаний : Лаборатория Базовых Знаний, 2016.
2. Э.О. Шатабаева, Г.А. Мун, Е.М.Шайхутдинов, В.В. Хуторянский Желатин: источники, получение и применение в пищевой промышленности и биомедицине // Chem Bull Kaz Nat Univ . - 2020. - №3. - С. 28-46.
3. Л.А. Бокерия, С.П. Новикова, О.Л. Бокерия, В.И. Костров, Р.Р. Салохединова, Л.Н. Николашина, О.В. Шустрова, В.С. Сивцев Пленочные композиции на основе желатина, структурированные разными способами // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. - 2014. - №4. - С. 60-72.
4. Ю. А. Нащекина, О. А. Луконина, Н. А. Михайлова Химические сшивающие агенты для коллагена: механизмы взаимодействия и перспективность применения в регенеративной медицине // ЦИТОЛОГИЯ. - 2020. - №7. - С. 459-472.
5. Jone Uranga, Bach T. Nguyen, Trung Trang Si , Pedro Guerrero, Koro de la Caba The Effect of Cross-Linking with Citric Acid on the Properties of Agar/Fish Gelatin Films // Polymers. - 2020. - №12.
6. J. Uranga, I. Leceta, A. Etxabide, P. Guerrero, K. de la Caba Cross-linking of fish gelatins to develop sustainable films with enhanced properties // European Polymer Journal. - 2016. - №78. - С. 82-90.
7. Rudnik Ewa Compostable Polymer Materials. Elsevier, 2008. - 211 p.
8. Милинкова Е. А., Дмитриев А. С. Биоразлагаемые пластики из возобновляемых ресурсов и их применение. М., 2004. 80 с
9. Химия и физика полимеров : учебно-методическое пособие для студентов направлений 18.03.01 "Химическая технология" профиля "Технология полимеров и продуктов переработки нефти", 04.03.01 профиля Химия "Медицинская и фармацевтическая химия" / Е. С. Широкова, М. А. Вохмянин, Е. И. Соколова ; ВятГУ, ИнХимЭК, каф. ХТПП. - Киров : ВятГУ, 2023. - 36 с
10. Ковязина Н. А. Изучение физико-химических свойств пленок лекарственных секстафаг // Вестник ВГУ. 2022. № 1. С. 78–84.
11. Жданова Г.О., ВЯтчина О.Ф., Быбин В.А., Стом Д.И., Федосеева Г.М. Использование *saccharomyces cerevisiae* для оценки биологической активности лекарственных препаратов. Сибирский медицинский журнал, 2013, № 4, с 104-106.